

35
deje.



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE E. coli
PRODUCTORA DE CITOTOXINAS A PARTIR DE
CARNE MOLIDA CRUDA, HAMBURGUESAS Y DE
UN BROTE DE DIARREA DEL VIAJERO**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A I
MA. DE JESUS RODRIGUEZ CADENA

DIRECTORES

DRA. SILVIA GIONO CEREZO

QFI. ANDREA A. BECERRIL OSNAYA

M EN C. MA. GUADALUPE RODRIGUEZ ANGELES

CUAUTITLAN, IZCALLI, EDO. DE MEXICO,

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

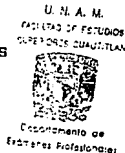
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JAI ME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Aislamiento e identificación de E. coli productora de citotoxinas
a partir de carne molida cruda, hamburguesas y de un brote de dia-
rrrea del viadero.

que presenta la pasante; Ma. de Jesús Rodríguez Cadena
con número de cuenta: 8754191-5 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 1 de Febrero de 1994

PRESIDENTE	<u>M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez.</u>	
VOCAL	<u>O.F.I. Andrea Becerril Osnaya.</u>	
SECRETARIO	<u>M. en C. Susana E. Mendoza Elvira</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>O.F.B. Marcela Hernández Vargas</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M. en C. Stella Maris Peginensi Rivera</u>	

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA MEDICA DE LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL Y EN EL LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA ENTERICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE DIAGNOSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLOGICOS BAJO LA DIRECCION DE LA DRA. SILVIA GIONO CEREZO, LA QFI. ANDREA BECERRIL OSNAYA Y LA M. EN C. GUADALUPE RODRIGUEZ ANGELES.

El hombre siempre ha tendido hacia metas de superación, pero no en todas las ocasiones estas metas se logran alcanzar. La súperación personal y profesional no siempre se consigue, debido a que los retos no se plantean con la estrategia adecuada para luchar contra una situación que sí podemos vencer.

AlfonsoLaraCastila

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento muy especial a la Dra. Silvia Giono Cerezo, a la QFI. Andrea Becerril Osnaya y a la M. en C. Guadalupe Rodríguez Angeles, por haber dirigido este trabajo, por el apoyo y consejos que me brindaron, por su amistad y por la disponibilidad que tienen para compartir con los demás lo que saben.

A los Sinodales, por la disposición e interés que prestaron en la revisión de este trabajo.

Al Dr. José Luis Mora Galindo por su asesoría en el uso de las computadoras y por su convivencia agradable en el área de cómputo

Mis más sincera gratitud a todos los que de alguna manera contribuyeron a la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por crearme con voluntad y libertad para elegir una profesión en la cual pueda alabarlo y servir a los demás. Gracias Señor por todo lo que me has dado a lo largo de la vida.

A mis Padres: Antonio y Felcitas

Por su amor, confianza y ejemplo que han hecho posible realizarme como persona y profesionista.

A mis tíos : Aquilino y Gloria

Gracias por compartir su hogar conmigo y por su invaluable ayuda en mi formación como profesionista.

A mis Hermanos : Norma, Antonio, Verónica y Araceli

Por el amor y apoyo que me han brindado en todo momento y espero que esta tesis llegue a significar un motivo de superación para ustedes.

A todos mis amigos en especial a Mateo por lo invaluable de su amistad.

CONTENIDO

	Páginas
IV.- Resumen.....	1
V.- Introducción.....	2
1. Antecedentes.....	5
2. Generalidades.....	8
3. Clasificación de <i>E. coli</i>	12
3.1 EHEC.....	12
3.2 EPEC.....	18
3.3 EIEC.....	21
3.4 ETEC.....	23
3.5 EAEC.....	27
4. Mecanismo de patogenicidad de <i>E. coli</i> productora de citotoxinas.....	29
4.1 Modo de acción.....	29
4.2 Modelos animales.....	32
4.3 Modelos moléculares.....	34
VI.- Justificación.....	38
VII.- Objetivo general.....	39
VIII.- Objetivos particulares.....	40

	Páginas
IX.- Material, medios de cultivo y reactivos.....	41
X.- Material biológico, muestras y cepas de referencia.....	43
XI.- Metodología.....	44
11.1 Estimación del contenido de coliformes en muestras de alimentos por el método de NMP.....	44
11.2 Aislamiento de de <i>E. coli</i> y otros enteropatógenos	
11.2.1 de alimentos.....	44
11.2.2 de heces de un brote de diarrea del viejo.....	46
11.3 Identificación por.....	46
11.3.1 pruebas diferenciales en tubo.....	46
11.3.2 pruebas miniaturizadas (sistema API-20 para enterobacterias).....	50
11.4 Pruebas de fermentación de sorbitol en tubo, placa y microplaca.....	50
11.5 Pruebas de serotipificación de cepas <i>E. coli</i>	51
11.6 Pruebas de citotoxicidad en cultivo celular VERO.....	55
11.6.1 Preparación del sobrenadante.....	55
11.6.2 Preparación de la microplaca.....	55
11.6.3 Ensayo de citotoxicidad.....	56
11.6.4 Interpretación.....	57
11.7 Prueba de la mancha con sonda LT.....	57
11.7.1 Preparación	57

	Páginas
11.7.2 Hibridación.....	59
11.7.3 Revelado.....	60
XII.- Resultados.....	61
XIII.- Discusión.....	91
XIV.- Conclusiones.....	98
XV.- Apendice.....	100
XVI.- Referencias.....	110

INDICE DE TABLAS

TABLA No. 1	Método de laboratorio para determinar citotoxinas
TABLA No. 2	Datos históricos en el estudio de las citotoxinas de <i>E. coli</i>
TABLA No. 3	<i>E. coli</i> como patógeno.
TABLA No. 4	Principales características bioquímicas de <i>E. coli</i>
TABLA No. 5	Comparación entre la toxina Shiga de <i>Shigella dysenteriae</i> y las toxinas tipo Shiga de <i>E. coli</i> .
TABLA No. 6	Características principales de <i>E. coli</i> enterohemorrágica .
TABLA No. 7	Características principales de <i>E. coli</i> enteropatógena.
TABLA No. 8	Características principales de <i>E. coli</i> enteroinvasiva.
TABLA No. 9	Características principales de <i>E. coli</i> enterotoxigénica.
TABLA No. 10	Estimación del contenido de coliformes en alimentos por el método de NMP
TABLA No. 11	Relación del contenido de coliformes por muestra total de CM y H con respecto a su origen y aislamientos positivos para <i>E. coli</i> .
TABLA No. 12	Porcentaje de <i>E. coli</i> y otros enteropatógenos aislados de CM y H
TABLA No. 13	Distribución de aislamientos de <i>E. coli</i> por edad y sexo de 23 muestras de diarrea del viajero recolectadas en Campeche.
TABLA No. 14	Porcentaje de aislamiento de <i>E. coli</i> y otros enteropatógenos recuperados de 23 muestras de un brote de diarrea del viajero en Campeche.
TABLA No. 15	Relación de muestras diarreicas del brote de Campeche con más de un enteropatógeno aislado.
TABLA No. 16	Frecuencia de aislamiento de <i>E. coli</i> provenientes de alimentos y muestras clínicas humanas.
TABLA No. 17	Frecuencia de aislamiento y comportamiento bioquímico de 104 cepas de <i>E. coli</i> aisladas de alimentos y muestras diarreicas .

- TABLA No. 18** Recuperación de cepas *E. coli* no fermentadoras de sorbitol aisladas de muestras de alimentos, de niños con y sin diarrea y de un brote de diarrea del viajero
- TABLA No. 19** Determinación de la Especificidad y Sensibilidad del Método de SOR-P en comparación con SOR-T y SOR-MP.
- TABLA No. 20** Tipificación serológica de 104 cepas de *E. coli* aisladas de carne molida cruda, hamburguesas, heces de un brote de diarrea del viajero y de niños con y sin diarrea.
- TABLA No. 21** Características fenotípicas y genotípicas de 7 cepas de *E. coli* serotipificadas y obtenidas de alimentos.
- TABLA No. 22** Características fenotípicas y genotípicas de 22 cepas de *E. coli* serotipificadas y obtenidas de heces humanas.
- TABLA No. 23** Detección de actividad citotoxigénica y / o enterotoxigénica en cultivo celular Vero y evidencias genéticas para LT por la prueba de la mancha en 104 cepas de *E. coli*
- TABLA No. 24** Porcentaje de cepas *E. coli* no tipificables con efecto en cultivo celular y prueba de la mancha (+) ó (-).
- TABLA No. 25** Recuperación de *E. coli* no fermentadoras de sorbitol asociadas a efecto citotóxico (CTX) o citotónico (CTT) en cultivo celular Vero.

INDICE

DIAGRAMAS , GRAFICAS Y FIGURAS

- DIAGRAMA No. 1** Estimación del contenido de coliformes en muestras de alimentos por el método de NMP.
- DIAGRAMA No. 2** Aislamiento de *E. coli* y otros enteropatógenos a partir CM y H
- DIAGRAMA No. 3** Aislamiento de *E. coli* y otros enteropatógenos a partir de heces provenientes de un brote de diarrea del viajero.
- DIAGRAMA No. 4** Pruebas bioquímicas en tubo para la confirmación de cepas de *E. coli*.
- DIAGRAMA No. 5** Identificación de cepas bacterianas por pruebas miniaturizadas (sistema API-20 para enterobacterias).
- DIAGRAMA No. 6** Pruebas de fermentación de sorbitol en tubo, placa y microplaca.
- DIAGRAMA No. 7** Serotipificación de cepas *E. coli*
- DIAGRAMA No. 8** Pruebas de citotoxicidad en cultivo celular VERO.
- DIAGRAMA No. 9** Prueba de la mancha LT no radioactiva.
-
- GRAFICA No. 1** Distribución porcentual de enteropatógenos aislados de 10 muestras de CM.
- GRAFICA No. 2** Distribución porcentual de enteropatógenos aislados de 10 muestras de H
- GRAFICA No. 3** Distribución porcentual de enteropatógenos aislados de muestras de alimentos.
-
- FIGURA No. 1** Modelo de entrada de la citotoxina SLT-I e inhibición de la síntesis de proteínas.
- FIGURA No. 2** Organización y expresión del operón de SLT-1.
- FIGURA No. 3** Control de las células VERO sin inocular (100X).

FIGURA No. 4 Control positivo del efecto citotóxico en células VERO (100X).

FIGURA No. 5 Control positivo de efecto citotónico en células VERO (100X).

FIGURA No. 6 Muestra problema con efecto citotóxico en células VERO (100X)

FIGURA No. 7 Muestra problema con efecto citotónico en células VERO (100X)

FIGURA No. 8 Membrana revelada por la técnica de NBT.

ABREVIATURAS

A	Alimentos
Ac	Anticuerpos
ADH	Arginina dehidrolasa
Ag	Antígeno
ARA	Arabinosa
AST	Agar soya tripticasa
BAB	Base de agar sangre
CaCo	Células de carcinoma de colon humano
CAT	Catalasa
CB	Prueba de la mancha
CE	Células de <i>E. coli</i> aisladas de niños con y sin diarrea
CC	Cultivo celular
CH	Colitis hemorrágica
CIT	Citratos de Simmon
CM	Carne molida cruda
CST	Caldo soya tripticasa
CT	Toxina colérica
CTT	Efecto citotónico
CTX	Efecto citotóxico
DNA	Acido desoxirribonucleico
EAE	Factor de adherencia de cepas EPEC
EAEC	<i>E. coli</i> enteroadherente
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva

ELISA	Inmuno ensayo enzimático
ENCB-IPN	Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Instituto Politécnico Nacional
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatógena
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
GEL	Licuefacción de gelatina
GLU	Glucosa
H	Hamburguesas
HA	Hemaglutinación
HeLa	Células de carcinoma de cérvix
Henle	Células intestinales de embrión humano
Hep-2	Células de carcinoma de larínge
IND	Indol
INDRE.....	Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia
INO	Inositol
LIA	Lisina descarboxilasa
LT	Toxina termolábil
MAN	Manosa
MEL	Melobiosa
MIO	Movilidad, indol y ornitina
NBT	Azul de Nitrotetrazolium
NMP	Número más probable
ODC	Ornitina descarboxilasa
PMN	Polimorfonucleares
RHA	Rammosa
RM	Rojo de metilo

SAC	Sacarosa
SLT	Toxina semejante a Shiga
SOR-MP	Sorbitol en micropalaca
SOR-P	Sorbitol en placa
SOR-T	Sorbitol en tubo
SS	Agar salmonella -shigella
ST	Toxina termoestable
SUH	Síndrome urémico hemolítico
TCBS	Tiosulfato-citrato-bilis - sacarosa
TSI	Agar hierro triple azúcar
URE	Urea
Vero	Células de riñón de mono verde africano
VP	Voges Proskauer
VT	Verotoxinas o citotoxinas Vero

GLOSARIO

- Aglutinación.**-Las reacciones de aglutinación consisten en la agregación de partículas tales como células o material sintético por anticuerpos llamados aglutininas
- Antibiótico.**- Sustancia química elaborada por diferentes especies de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos) que suprimen el crecimiento de otros microorganismos y puede eventualmente destruirlos.
- Anticuerpo.**- Es una molécula elaborada por animales en respuesta a un antígeno. El anticuerpo tiene la propiedad particular de combinarse específicamente con el antígeno el cual indujo su formación.
- Antígeno.**- Es una molécula que induce la formación de anticuerpos.
- Bacteriófago.** Virus que infectan células bacterianas.
- Clonación.**- Proceso por el cual se obtienen muchas copias de un gene a partir de una sola copia.
- Citotoxina.**- Toxina termolábil diferente a la LT de la *E. coli* enterotoxigénica, capaz de causar lisis o destrucción de células en cultivo confluyente Vero o HeLa
- Coliforme.**- Bacilos gram negativo no productores de esporas, aerobios o anaerobios facultativos capaces de fermentar lactosa con producción de ácido y gas .

- Diarrea.-** Aumento en la frecuencia de las evacuaciones, que se acompaña de un incremento en el contenido de agua en las heces.
- Exotoxina.-** Sustancia de naturaleza proteica liberada por algunas bacterias que pueden producir alteraciones en el transporte de líquidos y electrolitos y provocar daño en la estructura de la mucosa intestinal.
- Gene.-** Unidad básica de la herencia. Secuencia de DNA que codifica una proteína específica.
- Hibridación.-**Emparejamiento de cadenas sencillas de ácidos nucleicos para formar una doble cadena; las zonas de doble cadena indican complementariedad de las secuencias de bases nitrogenadas.
- Número más probable.-**Técnica estadística y matemática que expresa cuantitativamente la densidad de microorganismos en una muestra.
- Patogenicidad.-**Capacidad intrínseca de un grupo o especie que connota la producción de enfermedad.
- Toxina.-** Sustancia de origen microbiano que da lugar a cuadros clínicos bien definidos, sea en ausencia del microorganismo.
- Virulencia.-** Capacidad intrínseca de cepas de ser patógenas en grado variable.

IV. RESUMEN

Se estudiaron 104 cepas de *E. coli* aisladas de carne molida cruda, hamburguesas y muestras de materia fecal ; con la finalidad de investigar la capacidad para producir citotoxinas y enterotoxinas por ensayos en cultivo celular utilizando la línea Vero y su correlación con la expresión fenotípica; comportamiento bioquímico y serológico utilizando 13 sueros somáticos. La expresión genética relacionada con la producción de la toxina LT se realizó por pruebas de biología molecular empleando la técnica de la mancha o "colony blot."

Se aislaron 40 (38.4%) cepas de *E. coli* provenientes de alimentos y 64 (61.6%) de un brote de diarrea del viajero que se presentó en el febrero de 1992 en el estado de Campeche y de heces de infantes con y sin diarrea.

Del total de cepas *E. coli* 21 (20.1%) fueron sorbitol negativo por el método en placa utilizando agar MacConkey-sorbitol y se obtuvieron serotipos sorbitol negativo diferentes al O:157H:7: O:55, O:111, O: 125 y O:148. Serológicamente 6 cepas se clasificaron en el grupo EHEC y ninguna correspondió al serotipo O:157.

Mediante los ensayos de actividad citotóxica y/o enterotóxica en cultivo celular se identificaron 3 (2.8%) cepas productoras de citotoxinas, 74(71.1%) de LT y 17(16.3%) con ambos efectos, de las cepas productoras de citotoxinas 1 provenía de carne molida cruda y 2 de muestras diarreas.

La correlación entre producción de citotoxinas y la incapacidad de fermentar el sorbitol fue del 14.2% y entre cepas con efecto CTX-CTT fue del 28.4%. Una cepa *E. coli* aislada de un infante con diarrea fue sorbitol negativo asociada a efecto citotóxico en cultivo celular y aglutino con el antisuero O: 55 y una cepa aislada de un caso de diarrea en un niño estuvo asociada a efecto CTX y CTT. El 91.3% de las cepas tuvo evidencia genética para la codificación de LT.

V. INTRODUCCION

En México la diarrea infecciosa en infantes y viajeros representa uno de los principales problemas de salud pública; por datos estadísticos se sabe que aproximadamente ocurren de 30 - 42 millones de episodios diarreicos cada año en niños menores de 5 años y de 60 - 70 millones en población mayor con un 9.5% de diarreas sanguinolentas y un 9.2% de casos crónicos. (25)

Entre los agentes etiológicos causantes de diarreas sanguinolentas se incluyen cepas de *E. coli* productoras de citotoxinas (25). Este tipo de cepas fueron descritas inicialmente por Konowalchuck en 1977 a partir de filtrados de heces humanas, heces diarreicas de lechones y alimentos. (1, 38)

El prototipo de esta clase de *E. coli* es el serotipo O:157H:7; este agente se aisló e identificó en 1975 de una paciente con diarrea sanguinolenta (54); y desde esta fecha se considera como un patógeno relacionado epidemiológicamente con brotes esporádicos de diarrea sanguinolenta, gastroenteritis, Colitis Hemorrágica (CH) y Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) (3, 34, 58, 61). Estudios realizados en los Estados Unidos de Norteamérica, Canadá y Gran Bretaña revelaron que las infecciones gastrointestinales causadas por este patógeno están asociadas con el consumo de hamburguesas y leche bronca (3, 34, 61, 79, 80, 81). Actualmente se reporta la existencia de otros serotipos productores de citotoxinas en los que se incluyen los serogrupos: O:18, O:55, O:125, O:128 O:26 y O:111 (3, 38). Las infecciones gastrointestinales causadas por estos serotipos se caracterizan por la presencia de diarrea sanguinolenta y en ocasiones se puede presentar un cuadro febril leve, siendo los niños y los ancianos los que tienen mayor riesgo de presentar complicaciones. (16, 31, 34)

En México las infecciones por *E. coli* O:157H:7 con frecuencia no se identifican debido a que el cuadro clínico asociado no se conoce bien , además la mayor parte de los laboratorios de diagnóstico clínico no siembran de rutina las muestras de heces y alimentos en agar MacConkey-sorbitol (34, 44) y no cuentan con la infraestructura necesaria para demostrar la actividad de la toxina en filtrados fecales o aislamientos a partir de alimentos. La actividad citotóxica se puede verificar por diferentes métodos: biológicos, inmunológicos y moléculares que se enumeran en la Tabla No. 1. El ensayo en cultivo celular es la prueba de referencia para detectar y cuantificar la actividad citotóxica de cepas de *E. coli* . Este ensayo es sensible y las determinaciones se pueden realizar en diferentes líneas celulares como: Vero, CHO, HeLa y CaCo. (25, 34, 60, 81)

TABLA No. 1

Métodos de laboratorio para determinar citotoxinas

Pruebas biológicas:	<ul style="list-style-type: none">* Asa ligada de conejo* Inoculación intraperitoneal en ratón
Cultivo celular:	<ul style="list-style-type: none">* Células VERO* Célula intestinales de embrión humano (Henle)* Células HeLa* Células Hep-2* Células de fibroblastos de ratón* Células CaCo
Pruebas inmunológicas:	<ul style="list-style-type: none">* ELISA (método inmunoenzimático)* Radio inmuno ensayo (RIA)* Hemólisis inmune pasiva* Coaglutinación
Métodos de biología molecular:	<ul style="list-style-type: none">* Prueba de la mancha* Hibridación con sondas de DNA* PCR

Tomado de : Konowalchuck, J., J.I. Speirs and S. Stavric. 1977. Vero response to cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 18:775-779. (38)
O'Brien, A.D., G.D. LaVeck, MR. Thompson, and S.B. Formal. 1982. Production of *Shigella dysenteriae* 1 like cytotoxin by *Escherichia coli*. (51)

1. Antecedentes

E. coli es uno de los microorganismos más estudiados desde hace más de 100 años, sin embargo aún reserva muchas interrogantes por estudiar.

E. coli fué descrita por Theodor Escherich en 1886 al realizar estudios bacteriológicos en heces de infantes y esto constituyó el inicio de una serie de investigaciones sobre la patogenicidad de bacterias intestinales que causan infecciones contagiosas. (52, 72)

La relación entre *E. coli* y cuadros diarreicos se asoció antes de 1900 por veterinarios, al realizar estudios de campo y a partir de los años 50' tomó un gran auge el estudio de este microorganismo llegándose a esclarecer varios aspectos relacionados con su etiopatogenia, entre los cuales destacan los siguientes:

El primer estudio epidemiológico de *E. coli* como responsable de procesos diarreicos en humanos, fué reportado por Bray en 1945 y posteriormente Gyles y cols. aislaron e identificaron cepas *E. coli* causantes de un brote de diarrea en donde el 56 % de los niños infectados murieron; a esta cepa se le denominó *E. coli* alfa (20). En estudios posteriores se reconoció una segunda cepa involucrada en un brote de diarrea siendo serológicamente diferente a *E. coli* alfa (*E. coli* beta) (20, 52). Lo anterior fué corroborado mediante la tipificación serológica basada en el esquema de Kauffman y DuPont descrito en 1947 y se llegó a concluir que independientemente del país de origen las cepas asociadas a procesos diarreicos pertenecían a ciertos serogrupos. (20, 36)

De y cols en 1957 describieron la producción de una toxina semejante a la colérica elaborada por cepas de *E. coli* y se comenzó a hablar de una nueva línea en relación a la patogénesis de la diarrea provocada por cepas *E. coli* enterotoxigénica (ETEC). (12)

En 1975 Keush y Donta ,emplearon cultivos celulares Y1 (células tumorales de corteza adrenal de ratón) y células HeLa , para determinar la actividad biológica de diferentes toxinas y encontraron que existen al menos 2 tipos que producen un efecto citotónico debido a la esteroidogénesis y el aumento de AMPc (28, 37). Por esta época se descubrió también que los brotes de diarrea del viajero están asociados con mayor frecuencia a cepas ETEC (26) .

En 1982 se reconoció a *E. coli* O:157H:7 como un agente patógeno relacionado con brotes esporádicos de diarreas sanguinolentas asociadas al consumo de hamburguesas se llegó a esta conclusión cuando se presentaron 2 brotes aislados de CH en los estados de Oregon y Michigan, en donde el CDC (Center for Diseases Control) detectó a 47 individuos que presentaron un cuadro clínico característico de CH con cultivo positivo para *E. coli* O:157H:7 . En este mismo año quedó establecido el término de EHEC.(1, 27, 55) En la Tabla No. 2 se muestran algunos datos históricos en relación a diversos estudios fenotípicos y genéticos que se realizaron con la finalidad de caracterizar cepas *E. coli* productoras de citotoxinas.

En los Estados Unidos de Norteamérica de noviembre de 1992 hasta enero de 1993 se presentó un brote diarreico multiestatal en los estados de California, Nevada e Idaho. En la ciudad de Washington se reportaron hasta el mes de febrero más de 500 casos de infecciones gastrointestinales adquiridas por el consumo de hamburguesas en una cadena de restaurantes de comida rápida. En el 95.4% (447) de los pacientes se recuperó *E. coli* O:157H:7, 144 pacientes fueron hospitalizados, 30 presentaron un cuadro característico de SUH y 4 murieron a consecuencia de complicaciones asociadas a la infección. (46).

TABLA No. 2

Datos históricos en el estudio de las citotoxinas de *E. coli*.

Estudio	Conclusiones	Referencias
1era. descripción de una toxina en EPEC	Factor tóxico en H-19 (0:26K:60H:11) diferente a LT	Smith y Lingood (1971)
Demostración de citotoxinas en cultivo de tejidos	Citotoxina para células Citotoxinas para celulas HeLa.	Konowalchuk y cols (1977) O'Brien y cols (1982)
Nomenclatura	Verotoxina Citotoxina tipo Shiga VT-1, citotoxina neutralizable con antisuero Shiga y VT-2 a las no neutralizables	Konowalchuk y cols (1977) O'Brien y cols (1982) Strockine (1986) Scotland y cols (1985) OMS (1987)
Diagnóstico de laboratorio de Infecciones por VTEC	Ensayos de citotoxicidad Inmunológicos Hibridización	Konowalchuk y cols (1977) O'Brien y cols (1982) Donohue-Rolfe A cols (1977) Willshaw G.A. y cols (1986)

Tomado de: Parra-Maldonado N.R. 1990 Frecuencia y caracterización de cepas de *E. coli* productoras de citotoxinas (VTEC) en casos de diarrea en poblaciones urbana y rural . Tesis UNAM . (56)

2. Generalidades

E. coli es un bacilo gram negativo que pertenece a la familia Enterobacteriaceae. No forma esporas, posee microcápsula y la mayoría de las cepas son móviles mediante flagelos peritricos; su metabolismo es respiratorio fermentativo por lo que se le considera como un microorganismo aerobio o anaerobio facultativo. Genéticamente está constituida por una molécula circular de DNA con un peso molecular de 2×10^9 y alrededor de 5×10^6 pares de bases. (40, 72)

E. coli coloniza el intestino del hombre poco después de su nacimiento, persistiendo en él durante toda su vida y tiene un papel importante en el mantenimiento de las condiciones fisiológicas normales (41, 54, 72). Cuando sale de su nicho ecológico se le considera como un patógeno oportunista (40, 72) relacionado con diversos síndromes y enfermedades que se enlistan en la Tabla No. 3.

E. coli crece fácilmente en medios simples o enriquecidos con glicerol y glucosa como única fuente de carbono y energía. En medio líquido las cepas lisas producen una turbidez uniforme, mientras que las cepas rugosas se asientan en el fondo formando un depósito granular. En medios sólidos selectivos y diferenciales que contienen carbohidratos, las colonias son lisas, circulares, con borde entero, convexas y brillantes. (72)

En cuanto a características bioquímicas en la Tabla No. 4 se muestra el porcentaje de positividad que presenta *E. coli* con respecto a algunas pruebas bioquímicas de diferenciación. (9, 18)

La composición estructural de la pared celular de *E. coli* está constituida en su porción externa por: proteínas, lípidos y polisacáridos. Los lipopolisacáridos son mediadores de muchas actividades biológicas relacionadas con la patógenesis de la bacteria. (72)

TABLA No. 3

E. coli como patógeno

Enfermedades y síndromes relacionados
con infecciones causadas por *E. coli*

- * Gastroenteritis
- * Enteritidis prolongada
- * Diarrea en infantes
- * Diarrea del viajero
- * Diarrea sanguinolenta
- * Síndrome disentérico
- * Infecciones en el aparato
urinario inferior y superior
- * Pielonefritis
- * Colitis hemorrágica
- * Síndrome urémico hemolítico
- * Infecciones en heridas
- * Septicemias neonatales
- * Meningitis neonatal
- * Varias manifestaciones en
huésped inmunocomprometido

Tomado de: Diagnostic Procedures for bacterial
infections (1987); pag: 256.

TABLA No. 4

Principales características bioquímicas de *E. coli*

Bioquímica	% de positividad
Indol	98
RM	99
VP	0
CIT	1
Prod. de Ac. sulfhídrico	1
URE	1
LIA	90
ARG	17
ORN	65
Motilidad a 37°C	95
Hidrólisis de gelatina	0
Prod. de gas	95
Fermentación de:	
glucosa	100
lactosa	95
Sacarosa	50
D-manitol	98
m-inositol	1
D-sorbitol	94
L-arabinosa	99
Rafinosa	50
Maltosa	95
D-manosa	96
ONPG	95
Oxidasa	0

Tomado de: Farmer, J.J., y cols. 1985. Biochemical Identification of New species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 21:46-76 (18)

El lipopolisacárido de *E. coli* esta constituido por:

- a).- Fosfolípidos (lípido A).
- b).- Un centro polisacárido de 5 monosacáridos enlazados al lípido A por el ácido cetodesoxioctulosónico.
- c).- Un polisacárido externo constituido por 25 unidades repetidas de azúcares de 3 y 5 carbonos (Ag O). (72)

La cadena externa conforma el Ag O y farmacológicamente se considera como una endotoxina incluyendo el esqueleto interno y el lípido A. Estructuralmente *E. coli* también puede expresar determinantes antígenicos capsulares y flagelares. (53, 72)

Una de las propiedades de los Ag somáticos y capsulares es el de dar protección a la célula bacteriana actuando contra la acción bactericida de los fagocitos y el complemento. El Ag O es un componente termoestable que constituye la parte más externa de los lipopolisacáridos y se considera como un inmunógeno que suele identificarse mediante reacciones de aglutinación. El antígeno H al igual que el Ag K son termolábiles; el Ag K es de naturaleza polisacárida y se han descrito tres tipos diferentes: A, B y L. El antígeno H se localiza sobre los flagelos y puede ser desnaturalizado por calor o alcohol. Los antígenos O, K y H constituyen un esquema descrito por Kauffman y DuPont en 1947 para la tipificación serológica de *E. coli*. Existe para dicho mosaico antígeno más de 176 serogrupos reconocidos para el Ag O, 112 para el Ag K y 60 para el Ag H. Además de las propiedades serológicas se pueden tomar otras características como base para la tipificación de *E. coli* por ejemplo el uso de bacteriofagos y colisinas. (53, 72, 36).

3. Clasificación

De acuerdo a el mecanismo de patogenicidad, se reconocen 5 clases de *E. coli* productoras de diarrea. Cada clase tiene sus características de virulencia, presentación clínica, rasgos epidemiológicos y programas de tratamiento. La comprensión de estos patrones puede servir como guía para el manejo de muestras clínicas con el fin de caracterizar el o los agentes etiológicos responsables de brotes diarreicos, con base en pruebas de laboratorio: bioquímicas, serológicas y moléculares para su identificación (41, 54).

3.1 *E. coli* enterohemorrágica. (Tabla No. 6)

El serotipo O:157H:7 es el prototipo de las cepas EHEC, este serotipo se caracteriza por no fermentar el sorbitol y no producir la β glucuronidasa, además elabora citotoxinas que difieren de las enterotoxinas LT y ST de la *E. coli* clásica (44, 54, 60, 72). Dichas citotoxinas son termolábiles y se denominan Vero debido a su capacidad para lisar células de riñón de mono verde africano. (16, 66, 67, 72, 84).

Se han reportado dos tipos de toxinas VERO: VT-1 y VT-2, denominadas también toxina Shiga-like I y Shiga-like II respectivamente; debido a que poseen propiedades biológicas y fisicoquímicas similares a la toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* tipo 1 (16, 45, 51, 60, 66, 67). En la Tabla No. 5 se mencionan algunas características moléculares de las citotoxinas SLT-I y SLT-II de *E. coli* y de la toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* tipo 1.

Características generales y biología molecular de STL-I (VT-1)

VT-1 fué descrita por Konowalchuk y cols. en 1977 (38). Estructuralmente esta compuesta por una subunidad A y cinco B con pesos moleculares de 32000 y 7700 Daltones respectivamente. La subunidad B es idéntica a la de la toxina Shiga, únicamente un

TABLA No. 5

Comparación entre la toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* y las toxinas de tipo Shiga de *E. coli*

Organismo	Toxina	Neutralización con antitoxina Shiga.	Probable estructura de subunidades
<i>E. coli</i>	SLT-I	Si	1A 5B
<i>E. coli</i>	SLT-II	No	1A 5B
<i>E. coli</i>	SLT-IIv	No	1A 5B
<i>S. dysenteriae</i>	Shiga	Si	1A 5B

Organismo	Receptor	Mecanismo de Acción
<i>E. coli</i>	Gb3	N-glicosidasa
<i>E. coli</i>	Gb3	N-glicosidasa
<i>E. coli</i>	Gb4	N-glicosidasa
<i>S. dysenteriae</i>	Gb3	N-glicosidasa

Tomada de: Acheson D.W.K. 1992. Enterotoxines in the diarrhoea. *J. Infect.* 24:225-245. (1)

aminoácido en la fracción A las hace diferentes. Inmunológicamente es neutralizada por anticuerpos anti-shiga. (16, 17, 34, 60, 67)

Características generales y biología molecular de VT-2 (SLT -II)

VT-2 está compuesta por una subunidades A y cinco B, con pesos moleculares de 35000 y 10700 Daltones respectivamente. Esta toxina fué purificada utilizando el método para VT-1 (1, 16, 34, 60, 67).

Similitud entre VT-1 y VT-2

Estas citotoxinas provocan actividades biológicas muy semejantes como: Acumulación de fluidos en asa ligada de conejo y cuando son administradas por vía intraperitoneal a ratones provocan parálisis de miembros inferiores y en ocasiones la muerte (23, 67). Ambas citotoxinas tienen como receptor celular el glicolípidio globotrirosil-cerámico (Gb3) y están codificadas a nivel de bacteriofagos (H19A y H19B) (6, 17, 19, 67, 72). En resumen VT-1 y VT-2 son enterotóxicas en asa ligada de conejo, neurotóxicas en rata y citotóxicas en cultivo celular. (1, 51).

Diferencias entre la actividad biológica de VT-1 y VT-2 (1, 38, 58, 84)

- a) VT-1 es mil veces más activa que VT-2 sobre células vero.
- b) La dosis letal 50 % de VT-2 en conejos es 100 veces mayor que la de VT1.
- c) La diferencia más importante se establece en la respuesta a la inyección de las toxinas en el modelo de asa ligada de intestino de conejo. VT-2 produce una hemorragia franca y VT-1 ocasiona una diarrea moderada sin sangre.
- d) El punto isoeléctrico de VT-2 tiene valores que van de 4.1 a 6.5 mientras que para VT-1 se reporta un valor de 7.2
- e) Al comparar VT-1 y VT-2 en sus fracciones A y B se observó una homología del 57% y 60% en sus secuencias de nucleótidos y un 55% y 57% en la secuencia de aminoácidos respectivamente.

- f) **VT-1 requiere de medios carentes de hierro y se obtiene del sonicado de la masa bacteriana a partir de un cultivo en fase estacionaria, para VT-2 son adecuados los medios de cultivo que contengan hierro y la aparición de la toxina se da en la fase logarítmica.**

Se ha incluido un tercer tipo de citotoxinas semejantes a la toxina Shiga, estas citotoxinas están relacionadas a pacientes con edema y cultivo positivo para *E. coli* y tienen propiedades biológicas similares a SLT-I y SLT-II. Son neutralizadas con antisuero contra SLT-II, pero no para SLT-I y son más citotóxicas en células Vero que en HeLa. Las citotoxinas con estas características se les ha denominado toxina shiga-like II variante (STLv) (1, 34, 60)

Patogénesis

Las cepas de *E. coli* productoras de citotoxinas son uno de los agentes etiológicos más importantes " inductores " de diarreas sanguinolentas. Las cepas VT* están implicadas en complicaciones como SUH, CH , efectos renales , efectos neurológicos y cistitis hemorrágica. El cuadro clínico de una infección por EHEC se caracteriza por la presencia de dolor abdominal y excremento sanguinolento. En algunos pacientes el dolor abdominal es intenso -prominente y la diarrea no es hemorrágica. Aproximadamente del 2 -7% de los pacientes desarrollan SUH , con una tasa de mortalidad del 3 - 5%. (27, 34, 66)

El SUH se define por una tríada de características: dolor renal agudo, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática. Estas alteraciones se presentan debido a la afección que sufren las células endoteliales a través de la coagulación intracelular , depósitos de fibrina y disminución de la velocidad del flujo del riñón. Diferentes agentes etiológicos incluyendo drogas, citotoxinas y microorganismos se postulan como causantes potenciales de dicho síndrome, por lo que se considera de naturaleza multifactorial debido a que esta *dado* por un número diferente de eventos y mecanismos patógenos. (34, 72)

Evidencias epidemiológicas y frecuencia

El aislamiento de O:157H:7 de heces de ganado vacuno indica que los bovinos son importantes reservorios de este microorganismo el cual habita en el intestino del ganado sano y puede contaminar la carne durante la matanza (34, 61). Se ha observado también que *E. coli* O:157H:7 tiene la posibilidad de colonizar gallinas (3, 54, 79, 80).

Historicamente O:157H:7 es un serotipo raramente aislado de humanos y animales (79, 80). Datos de un estudio multicéntrico nacional de 2 años de duración realizado en Estados Unidos, reveló que cuando se busca de rutina *E. coli* O:157H:7 en coprocultivos, este microorganismo se asocia más frecuentemente que *Shigella*. En este estudio se observó una frecuencia de aislamiento del 7.8%. Cuando se busca *E. coli* O:157H:7 en carne de bovino su frecuencia de aislamiento no es mayor del 2%. (25, 79)

En nuestro país el aislamiento de *E. coli* productora de citotóxicas asociada a diarrea con sangre es menor del 0.5%. y hasta la fecha no se tiene conocimiento de reportes de aislamientos a partir de alimentos. (25)

Diagnóstico de laboratorio

El aislamiento en medio MacConkey con sorbitol ayuda en la selección de cepas *E. coli* O:157H:7 y el diagnóstico se comprueba a través de pruebas serológicas somáticas y flagelares (44, 81). Existen también ensayos en los que incluye detección de VT libre y aislamiento de *E. coli* productora de verotoxinas, pruebas de hibridación con DNA, ensayos de ELISA para detectar VT-1 y VT-2, anticuerpos monoclonales y pruebas de citotoxicidad en cultivo celular (34, 60, 66). Actualmente en laboratorios de referencia se utilizan pruebas de biología molecular como PCR para realizar estudios genéticos que identifiquen y caractericen este tipo de cepas (25, 49, 81).

TABLA No. 6

Características principales de *E. coli* enterohemorrágica.

BHEC	
Características generales	Elabora citotoxinas que son denominadas Vero o toxinas shiga-like. Existen dos tipos que provocan efectos citotóxicos en línea celular VERO y actúan a nivel de síntesis de proteínas inactivando células del huésped
Grupos somáticos asociados	157, 26 y 111
Patogénesis	<ul style="list-style-type: none"> - Diarrea sanguinolenta. - Síndrome urémico hemolítico. - Colitis hemorrágica.
Distribución geográfica	Mundial
Grupos de edad afectados	Todas las edades
Modo de transmisión	<ul style="list-style-type: none"> - Productos alimenticios al parecer de origen animal (Hamburguesas). - Persona a persona
Periodo de incubación	De 3.8 a 8 días.
Cuadro clínico	<ul style="list-style-type: none"> - Excremento sanguinolento <li style="padding-left: 20px;">SUH - Dolor renal agudo. - Trombocitopenia. - Anemia hemolítica microangiopática.
Frecuencia de aislamiento (carne)	- 2 %
Diagnóstico de laboratorio	<ul style="list-style-type: none"> - Prueba de sorbitol. - Serología somática y flagelar. - Detección de VT libre. - Aislamiento de VTEC - ELISA para detectar VT-1 y VT-2. - Cultivo celular. - Hibridación con DNA - Anticuerpos monoclonales
Tratamiento	<ul style="list-style-type: none"> - Rehidratación oral. - Control de complicaciones fisiológicas.

Tomado de: (16, 22, 34, 36, 41, 53)

Factores que disminuyen la probabilidad del diagnóstico de VTEC. (34)

- Intervalo en el tiempo entre la aparición de la enfermedad y el estudio bacteriológico.
- Tardanza en el transporte de la muestra.
- Condiciones de mantenimiento de la cepa o de la muestra.
- Congelamiento y descongelamiento de la cepa o de la muestra .

Tratamiento

El tratamiento de pacientes con infecciones causadas por VTEC consiste en el control de las complicaciones fisiológicas que se presentan como: anemia, daño renal, hipertensión, etc. En este caso el papel de los antibióticos es cuestionable debido a que incrementan el riesgo de infección por alteración de la flora normal presentandose complicaciones. No obstante algunos investigadores sugieren el uso de trimetrop(n-sulfametoxazol e inhibidores de la vía del calcio porque evitan el efecto citotóxico (23, 34).

3.2. *E. coli* enteropatógena (Tabla No. 7)

El primer grupo de *E. coli* EPEC inductora de diarrea fué reconocida durante las décadas de los años 40 y 50 y se le designó así por Neter y cols. (47), quienes confirmaron la presencia de ciertos grupos serológicos, al demostrar que los serotipos 0:26,0:55, 0:111,0:119,0:125, 0:126,0:127,0:128 y 0:142 están relacionados frecuentemente con casos de diarrea infantil. Sin embargo la ausencia de propiedades virulentas demostrables llevaron a muchos investigadores a rechazar a la EPEC como un patógeno, aunque su capacidad para provocar diarrea ya había sido confirmada por estudios realizados en voluntarios, a los cuales se les administró por vía oral una dosis de 10^5 a 10^6 microorganismos. (39,40, 42)

En 1965 Neter y cols. (47) resumieron algunas evidencias que apoyaban la enteropatógenidad de estas cepas, entre las cuales destacan las siguientes:

- a) La mayor frecuencia de brotes diarreícos se presentan en grupos cerrados
- b) Las cepas EPEC se aíslan con mayor frecuencia de materia fecal de lactantes con diarrea que de heces de lactantes sanos
- c) La capacidad de provocar diarrea en voluntarios humanos está asociada a la administración oral de un solo serogrupo.
- d) Se demostró la presencia de anticuerpo (Ac) específicos contra el grupo EPEC en pacientes como en voluntarios convalescientes.

Polotsky y cols. (59) notaron que algunas cepas EPEC causan lesiones histopatológicas en intestino humano que puede ser apreciado por microscopía electrónica; algunos autores asocian este efecto a la capacidad de ciertas cepas para producir adherencia.

Cravioto en 1979 describió por primera vez la adherencia de cepas EPEC a células Hep-2 y Baldini en 1983 encontró que la adherencia se debe a una adhesina que está relacionada con un plásmido de 55 a 70 megadaltons llamado factor de adherencia de cepas EPEC (EAF) y es quizá el único mecanismo de patogenicidad descrito hasta la fecha para esta clase de *E. coli*. (10)

Los estudios epidemiológicos de brotes de diarrea revelan que ciertas cepas EPEC son responsables de casos de diarrea en niños en menores de 5 años que viven en países subdesarrollados. Una infección por EPEC es limitada pero en algunos casos se puede presentar una enteritis prolongada. Las EPEC son reconocidas también como una causa de diarrea del viajero y los serotipos 0:26 y 0:111 se han asociado a SUH y CH, por este hecho y por la capacidad de algunas cepas para producir citotoxinas algunos autores proponen su incorporación al grupo EHEC (16, 34, 61, 66).

El cuadro clínico de una infección por EPEC se caracteriza por la presencia de dolor

TABLA No. 7

Características principales de *E. coli* enteropatógena

EPEC	
Características generales	EPEC fué la <i>primera</i> clase de <i>E. coli</i> que fué reconocida como causante de diarrea en niños. Evidencias indican que está clase de <i>E. coli</i> no tiene la capacidad de invadir tejido y no produce toxinas LT o ST.
Grupos somáticos asociados	26,44,55,86,111,114,119,125,126,127, 128 y 142
Patogénesis	<ul style="list-style-type: none"> - Diarrea en infantes. - Enteritidis prolongada. - Gastroenteritis - Diarrea del viajero - SUH
Distribución geográfica	Mundial
Grupos de edad afectados	Recién nacidos y lactantes
Modo de transmisión	- Alimentos contaminados.
Mecanismo de patogenicidad	<ul style="list-style-type: none"> - Adherencia a células epiteliales. - Citotoxinas
Cuadro clínico.	<ul style="list-style-type: none"> - Diarrea con sangre (ocasionalmente) - Fiebre. - Dolor abdominal. - Vómito.
Diagnostico de laboratorio	<ul style="list-style-type: none"> - Serología - Pruebas de hemaglutinación.
Tratamiento	<ul style="list-style-type: none"> - Rehidratación oral. - Cotrimoxazol.

Tomada de: (10, 23, 30, 34, 41, 42)

abdominal severo, fiebre y las evacuaciones son frecuentes con moco , PMN y sangre. (41, 76). El diagnóstico de laboratorio se da a través de pruebas especiales incluyendo serotipificación , hemaglutinación y pruebas de adherencia en células Hep - 2 (62, 72).

En cuanto al tratamiento se ha observado que infantes con diarrea intratable pueden responder a cotrimoxazol, sin embargo en algunos pacientes se pueden presentar recaídas después de la utilización de este antibiótico, por lo que se considera que una terapia antimicrobiana no parece ser representativa en el tratamiento de las infecciones causada por EPEC. Lo más recomendable es la rehidratación (66).

3.3 *E. coli* enteroinvasiva. (Tabla No. 8)

En 1971 Dupont y cols. (15) estudiaron cepas de *E. coli* con capacidad de penetrar, colonizar y multiplicarse en células de la mucosa del colon. Estas cepas son serológicamente diferentes a EPEC y ETEC y su característica de enteroinvasiva esta asociada a la presencia de un plásmido de aproximadamente 140 Mda que codifica para la producción de proteínas de membrana externa involucradas en el proceso invasivo (41, 73).

La patogénesis de las cepas EIEC se caracteriza por la presencia de una enfermedad parecida a la disentería debido a la invasión y destrucción de la mucosa del intestino grueso, esta infección por lo general se presenta fiebre ligera o síndrome febril, calambres, dolor abdominal, malestar y toxemia. Las muestras de heces suelen presentar PMN, moco y sangre con color sanguinolento-verdoso y consistencia viscosa (41, 55, 66, 72)

La EIEC puede diagnosticarse por serotipificación o mediante pruebas de ELISA que determinan proteínas de membrana externa o por pruebas de biología molecular utilizando sondas marcadas preparadas con fracciones de DNA obtenidos a partir del plásmido de 140 Mda (25, 41, 73).

TABLA No. 8

Características principales de *E. coli* enteroinvasiva.

EIEC	
Características generales	Estas cepas son serológicamente distintas a ETEC y EPEC, son capaces de invadir células de la mucosa del colon e inducen una enfermedad diarreica hemorrágica.
Grupos somáticos	28ac, 112ac, 124, 136, 143, 144, 152, 164 y 167
Patogénesis	- Síndrome disentérico
Distribución geográfica	Mundial
Grupos de edad afectados	Todas las edades
Modo de transmisión	Alimentos contaminados
Periodo de incubación	- 2 a 3 días
Mecanismo de patogenicidad	Invasión y multiplicación en células epiteliales
Cuadro clínico	- Dolor abdominal severo, - Evacuaciones frecuentes con moco y sangre. - Fiebre
Frecuencia	- 10 - 20 %
Diagnóstico de laboratorio	- Prueba de Serey - Prueba de invasividad en cultivo celular HeLa. - Detección de DNA - Perfil de plásmidos - Ensayos de inmunoadsorción.
Tratamiento	- Rehidratación oral. - Cuidados intensivos. - Rara vez se indican antibióticos

Tomada de: (10, 23, 34, 41, 66)

A nivel de investigación se utiliza la prueba de Sereny en donde se observó la producción de queratoconjuntivitis en conejos o cerdos y por pruebas en cultivo celular utilizando líneas HeLa o Hep - 2 para observar el efecto invasivo característico de estas cepas en el modelos de pruebas biológicas experimentales (41, 42, 54, 74).

Dado que la EIEC no causa perforación del intestino y que la enfermedad es moderada, los antibióticos raramente se indican, solamente en casos graves se recomienda el uso de Trimetropin - Sulfametoxazol (41).

3.4 *E. coli* enterotoxigena. (Tabla No. 9)

Las cepas enterotoxigenas de *E. coli* son las causantes en mayor proporción de diarrea del viajero y gastroenteritis en países en desarrollo. Su virulencia se debe a la capacidad de producir enterotoxinas y organelos que se adhieren a superficies específicas el epitelio intestinal (41, 42, 66, 72). Se conocen dos clases de enterotoxinas : Las toxinas termolábiles LT-I y LT-II que son inactivas a 60°C por 30 minutos y las toxinas termoestables: STa y STb son resistente a 100°C por 15 minutos (41, 42, 72).

La LT-I es una proteína con un peso molecular de 86,500; se localiza en el espacio periplásmico y solamente una pequeña cantidad se libera al medio de cultivo. Estructuralmente está dividida en fragmentos: A1, A2 y 5 fragmentos B unidos por enlaces no covalentes y tiene una gran semejanza a nivel de estructural, antigénicidad y actividad a la toxina elaborada por *V. cholerae* (CT) (34, 72). Dallas y Falkow, compararon las secuencias de aminoácidos entre CT y LT y encontraron un 78% de homología. (1)

Los fragmentos A y B son sintetizados a partir de péptidos de 18 y 21 aminoácidos

respectivamente . Clemens y Finkelstein , reportaron que la subunidad A se activa mediante un tratamiento proteolítico y que la subunidad B es la responsable de unir la toxina a la célula epitelial blanco a través de su unión con el gangliósido GM1 que actúa como receptor celular. El fragmento A1 tiene actividad tóxica estimulando el sistema adenilato ciclasa y se provoca una hipersecreción prolongada (1, 23, 72)

LT-II tiene actividad biológica similar a CT o LT- I, pero no es neutralizada con los anticuerpos contra dichas toxinas. Generalmente este tipo de toxinas se aísla con mayor frecuencia de cepas obtenidas de cerdos (23, 72).

Las toxinas termoestables son codificadas a nivel de plásmidos (72) y están formadas de un péptido de 2KDa, no son antigénicas y se conocen al menos 2 tipos de ST (STa y STb). STa tiene asociación con la inducción de diarrea activando el sistema guanilato ciclasa en la fracción membranal siendo tejida específica de la mucosa y estimula la secreción de GMP cíclico, es soluble en metanol y no pierde actividad con fenol, cloroformo, acetona, lipasa y tripsina. Es inactiva en ratón lactante, pero no en asa ligada de yeyuno porcino. STb tiene un papel incierto (1, 23, 28, 64).

La alteración más común asociada a ETEC se denomina diarrea del viajero, la cual es un síndrome y no una enfermedad que puede tener un origen infeccioso. La diarrea del viajero es un problema de Salud Pública que se presenta entre los turistas provenientes de zonas templadas que viajan a regiones endémicas de climas cálidos . Se sabe que aproximadamente 300 millones de turistas viajan por el mundo cada año y se estima que 1 de cada 3 tienen alto riesgo de padecer diarrea durante su viaje; esto depende de las características del viajero, del lugar, de las actividades que desarrolle pero sobre todo del consumo de alimentos y bebidas contaminadas con algún agente infeccioso. La diarrea del viajero puede tener un origen no infeccioso y esto se debe a alteraciones en los hábitos intestinales debido a cambios de horario

en la alimentación exceso en la ingestión de bebidas alcohólicas y a factores psicológicos o emocionales (7, 26).

La diarrea del viajero tiene una multiplicidad de nombres que se le atribuyen de acuerdo a la región , entre los que destacan: "Venganza de Moctezuma", "Galope griego", "Brote turco" y "Carreras romanas" esto indica la extensión del problema (2).

Este síndrome se caracteriza por la presencia de diarrea acuosa con sangre, dolor abdominal, vómito y ocasionalmente se llega a presentar fiebre. Se transmite a través del consumo de agua, ensaladas, vegetales crudos y frutas o por el contacto entre personas con malos hábitos de higiene (7, 40, 41, 66, 72).

En un estudio realizado en México se reportó que los alimentos son el principal vehículo de transmisión sobre todo si son consumidos en puestos ambulantes en donde la calidad higiénica de los alimentos y agua, así como los servicios de saneamiento ambiental en lugares turísticos son el motivo principal de contraer la diarrea infecciosa del viajero (7).

En cuanto al periodo de incubación se reporta que la diarrea aparece en forma rápida y no se detecta un tiempo de incubación, lo anterior depende del estado nutricional del individuo. La duración media de una infección causada por ETEC es aproximadamente de 5 días, aunque esto depende del área geográfica donde se presente el brote. En áreas donde el viajero enferma se estima una frecuencia del 35-40% y aproximadamente un 15% con respecto a los turistas que enferman al llegar a su hogar (7).

En México se han hecho diferentes estudios que indican que del 30 - 80% de los turistas que viajan a nuestro país desarrollan cuadros diarreicos, los cuales raramente llegan a ser graves, pero son incapacitantes y ocasionan molestias, cambios de itinerario y gastos de medicamentos.

TABLA No. 9

Características principales de *E. coli* enterotoxigénica

ETEC	
Características generales	Produce dos tipos de toxinas: LT y /o ST, la primera activa el sistema adenilato ciclasa provocando una hipersecreción prolongada, la segunda activa el sistema guanilato ciclasa.
Grupos somáticos asociados	6,8,15,20,25,27,63,78,114,128,148,153,159,167
Patogénesis	<ul style="list-style-type: none"> - Gastroenteritis - Diarrea del viajero
Distribución geográfica	Países en desarrollo y áreas tropicales.
Grupos de edad afectados	Niños de todas las edades y turistas adultos.
Modo de transmisión	<ul style="list-style-type: none"> - Agua y alimentos contaminados. - Persona - Persona.
Periodo de incubación	La diarrea aparece en forma repentina
Mecanismo de patogenicidad	Enterotoxinas LT y /o ST
Cuadro clínico	<ul style="list-style-type: none"> - Dolor abdominal. - Vómito - Fiebre
Frecuencia	35 a 40 %
Diagnóstico de laboratorio	<ul style="list-style-type: none"> - Serología somática y flagelar - Asa ligada de conejo - ELISA - Aglutinación en partículas látex. - Cultivo celular. - Hidridización de DNA.
Tratamiento	<ul style="list-style-type: none"> - Rehidratación oral. - Tetraciclina. - Oxalato de bismuto. - Cotrimoxazol

Tomada de: (7, 23, 34, 41, 66)

Para la determinación de ETEC se utilizan ensayos *in vitro* e *in vivo*; de estos últimos, los modelos animales más utilizados son los de asa ligada de conejo y cerdo. Se utilizan también pruebas inmunológicas como ELISA, aglutinación en partículas látex, coaglutinación y radioinmunoensayo. Entre otros métodos de identificación se dispone del uso de pruebas basadas en el efecto citotónico de LT en diferentes líneas celulares como: Vero, CHO o Y1 adrenales (23, 66, 72).

3.5 *E. coli* enteroadherente.

Un grupo aún no bien definido es el EAEC. Se ha observado que algunas cepas de *E. coli* pueden presentar fenotipos diferentes de adherencia. El primero es el de adherencia localizada; este fenotipo se caracteriza por la formación de grupos compactos de bacterias, que se agrupan sobre la superficie celular. Un segundo patrón de adherencia denominada difusa verdadera se caracteriza por la adherencia uniforme de microorganismos únicos sobre las células de cultivo y último patrón involucra autoaglutinación de células bacterianas, observándose agregados como ladrillos apilados (10, 21).

Mathewson y cols encontraron que existía mayor frecuencia de aislamiento de cepas *E. coli* que presentan un patrón de adherencia localizada o difusa en células Hep-2 en individuos con diarrea que en personas no enfermas, al serotipificar estas cepas observaron que no pertenecían a los serogrupos ya establecidos o raramente fueron EPEC (21). Por el contrario Cravioto y cols (10) trabajando en México, obtuvieron diferentes datos. Ellos observaron adherencia a células Hep-2 en la mayoría de las cepas EPEC; esto condujo a la demostración de una adhesina específica a Hep-2, denominada EAF, estos hallazgos se correlacionan con la capacidad de ciertos EPEC para causar diarrea en el hombre (68).

Los grupos serológicos asociados son indefinidos hasta el momento y por estudios epidemiológicos se ha llegado a establecer que existe una frecuencia elevada de aislamientos de *E. coli* enteroadherente en niños que viven en países en vías de desarrollo o turistas que viajan a estos (21).

La presencia de necrosis hemorrágica en asas intestinales de conejo y rata son algunas de las lesiones histopatológicas características que las diferencia de las cepas EHEC, EPEC, EIEC y ETEC. Actualmente se están realizando investigaciones en cultivo celular y estudios de biología molecular empleando sondas sensibles y específicas de DNA y pruebas de inmunanálisis, con la finalidad de facilitar el estudio epidemiológico y caracterizar clínicamente en el laboratorio las infecciones diarreogénicas causadas por esta clase de *E. coli*. (21, 81).

4. Mecanismos de patogenicidad de *E. coli* productora de citotoxinas.

4.1 Modo de acción

Una infección gastrointestinal por *E. coli* productora de citotoxinas se presenta cuando la bacteria resiste las defensas naturales como: acidez gástrica, capa de moco, peristaltismo, microflora intestinal y la respuesta inmunológica del intestino (producción de IgA) (1, 69).

Para que se lleve a cabo el proceso de patogenicidad la bacteria se adhiere a la célula blanco, la coloniza y se multiplica (1, 69). Un modelo de colonización en animales infectados natural o experimentalmente por *E. coli* productora de verotoxinas, sugiere que el fenómeno de "attaching and effacing" está relacionado con cepas productoras de citotoxinas, fenómeno por el cual se presentan lesiones a lo largo de la mucosa intestinal (19)

Algunos investigadores sugieren que el efecto patógeno de las cepas EHEC se da por la acción de uno o varios factores de virulencia como: producción de citotoxinas VT-1 y VT-2 poder de adherencia y fenómeno de " attaching and effacing ". Estos factores alteran el funcionamiento normal de absorción de agua y electrolitos y como consecuencia se presenta un proceso diarrefco (19).

Tzipori y cols. en 1987 determinaron que la producción de VT o la presencia de un plásmido de 60 MDa , no es requerida para causar diarrea . Ellos observaron que la presencia de diarrea se correlaciona con lesiones " attaching and effacing " que ocurren independientemente de la asociación con plásmido ó citotoxinas (77).

Cada subunidad de las citotoxinas VT-1 y VT-2 juega un papel esencial en la sensibilización e intoxicación de las células del huésped. La subunidad B es la responsable de unir la toxina con el receptor celular Gb₃ . Este receptor es de naturaleza glicoproteica y puede ser destruído por proteinasas, fosfolipasas y lisozima La subunidad A, activada por un

proceso proteolítico es la responsable de la inhibición de la síntesis de proteínas por una inactivación catalítica en la célula blanco (6, 34).

Unión con el receptor e internalización.

Keusch, Jacewicz y Donahue-Rolfe en 1991 demostraron la unión específica de las citotoxinas a la membrana de hígado de rata y células HeLa , este modelo explica el mecanismo de entrada de las citotoxinas SLT-I y toxina Shiga a las células blanco vía receptor (37), el cual se encuentra en los enterocitos y también se localiza abundantemente en células de la corteza del riñón, por lo que Padhyf y cols (1992) sugieren que la identificación de G_b como receptor funcional de VT-1 y VT-2, es consecuente con el papel etiológico de las cepas productoras de citotoxinas (6, 54, 72).

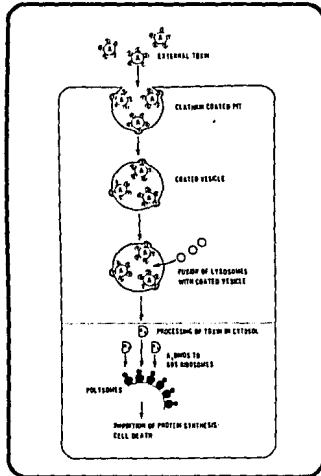
Inhibición de la síntesis de proteínas

En la inhibición de la síntesis de proteínas se bloquea la elongación de la cadena del péptido a nivel del ribosoma 60s y se inhibe la unión del aminoacil RNA^t con los ribosomas dependientes del factor 1 del alargamiento de la biosíntesis de la cadena de DNA, por lo tanto se considera que la subunidad A es una enzima que cataliza el rompimiento del enlace N-glicosídico en la base adenina 4324 del RNA^r 28s de la subunidad ribosomal 60s y esta actividad es la que produce la inhibición irreversible de la síntesis de proteínas y la muerte celular (1, 17, 36, 50).

Charne y cols (1976) sugieren que las citotoxinas estimulan directamente la actividad de la adenilato ciclasa y se incrementan los niveles de AMPc provocando acumulación de fluido en el lumen intestinal. Gemmell en 1984 corroboró lo anterior al trabajar en modelos animales y observó que las citotoxinas provocan hemorragias en la mucosa intestinal debido a la actividad citotóxica y como efecto secundario activan el sistema adenilato ciclasa (23).

FIGURA No. 1

Modelo de entrada de la citotoxina SLT- I e inhibición de la síntesis de proteínas.



La subunidad B se une al receptor GB, de la célula y la entrada de la citotoxina al citoplasma es mediada por un proceso de endocitosis, se forma una vesícula, se acidifica y se fusiona con los lisosomas. La subunidad A1 se activa y provoca la inhibición de la síntesis de proteínas (14, 50, 54)

4.2 Modelos animales

Existen diversos modelos animales que se han desarrollado para estudiar el mecanismo de patogenicidad del serotipo O:157H:7 y otros productores de altos niveles de citotoxinas.

Al parecer el uso de ratón lactante, cerdos y terneras genotóxicas son los modelos apropiados para el estudio de la colonización e inducción de diarrea. El mecanismo de colonización de *E. coli* O:157:H7 en cerdos genotóxicos se asemeja al modelo de la EPEC. Algunas investigaciones han reportado la presencia de un plásmido de 60 - 70 MDa en cepas de *E. coli* O:157H:7 y otras productoras de citotoxinas; a este se le ha asociado la expresión de un antígeno fimbrial relacionado con el proceso de colonización (50, 54).

Pai y cols. en 1986 observaron que conejos inoculados intragástricamente con una dosis 10^8 de *E. coli* O:157H:7, desarrollaban diarrea y presentaban daño en el epitelio de la mucosa del colon medio y distal; estas lesiones se caracterizaron por la muerte celular en la superficie del epitelio, el incremento de la actividad mitótica en las criptas, la disminución de la mucina y la infiltración de neutrófilos en la lámina propia y en el epitelio (50, 54).

Farmer y cols. inoculando una dosis conocida de *E. coli* O:157H:7, por vía nasofaríngea a cerdos, mono rhesus y ratón; observaron que en todos los animales trabajados se presentaban procesos diarreicos con sangre (50, 54).

El daño histopatológico que causan las cepas productoras de citotoxinas a nivel de vasos pequeños se ha estudiado modelos animales y los resultados obtenidos se han comparado con el daño en endotelio vascular que presentan las personas que han muerto por SUH (50, 54).

Beery diseñó algunos estudios en animales para evaluar el papel de las citotoxinas en el desarrollo de SUH y CH y observó que la inoculación intraperitoneal o intravenosa en ratones produce lesiones en el colon y en el riñón, distrofia vascular, acumulación de sangre en el lumen y pared del colon (50, 54).

1.3 Modelos moleculares

Como consecuencia de la aparición de cepas *E. coli* productoras de una toxina termolábil diferente a la LT de la *E. coli* enterotoxigénica, algunos investigadores diseñaron modelos animales y posteriormente moleculares con el fin de aclarar las interrogantes que surgieron en torno a la virulencia, patogenicidad, epidemiología y mecanismo de acción de las cepas *E. coli* productoras de citotoxinas.

Entre modelos moleculares que han surgido para aclarar estas interrogantes, destacan los siguientes:

Scotland y cols en 1980 realizaron estudios genéticos de la producción de VT y observaron que esta característica está codificada a nivel de fagos. En experimentos posteriores demostraron que el fago contiene DNA con un peso molecular de 30×10^6 (50, 63). De acuerdo a estos antecedentes Willshaw y cols. en 1985 realizaron clonación de genes con el fago H:19 de la cepa O:26 H:11 para obtener una cepa productora de citotoxinas y mediante estos estudios identificaron un fragmento de 2.5 Kb y observaron que existen diferentes genes que codifican para la producción de las citotoxinas (82)

Newland y cols en 1988 clonaron genes para la producción de SLT-II de *E. coli* e identificaron una región con fragmentos de 4.9 Kb del fago 933W, asociada a la producción de SLT-II (48, 49)

En experimentos adicionales se demostró que la organización genética para SLT-I es semejante a la SLT-II; observándose que fragmentos de DNA de SLT-II son homólogos en un 50 - 60% con genes estructurales del DNA de SLT-I (50).

Whittam y cols. en 1988 mediante una detección electroforética de variación alélica

caracterizaron genotipos cromosomales de bacterias aisladas de pacientes con SUH o CH . Los resultados obtenidos fueron utilizados para el análisis clonal de la relación de O:157H:7 y otros serotipos productores de verotoxina aislados de personas con SUH o CH. Al realizar la comparación genética se observó que la clona de O:157H:7 es única, distante y que está relacionada con otros patógenos productores de citotoxinas . De acuerdo a el análisis de los genotipos de *E. coli* O:157H:7 se concluyó que este organismo es de reciente descendencia de una célula ancestral. Este descubrimiento supone la hipótesis de que el aislamiento de *E. coli* O:157H:7 pertenece a una sola clona (80).

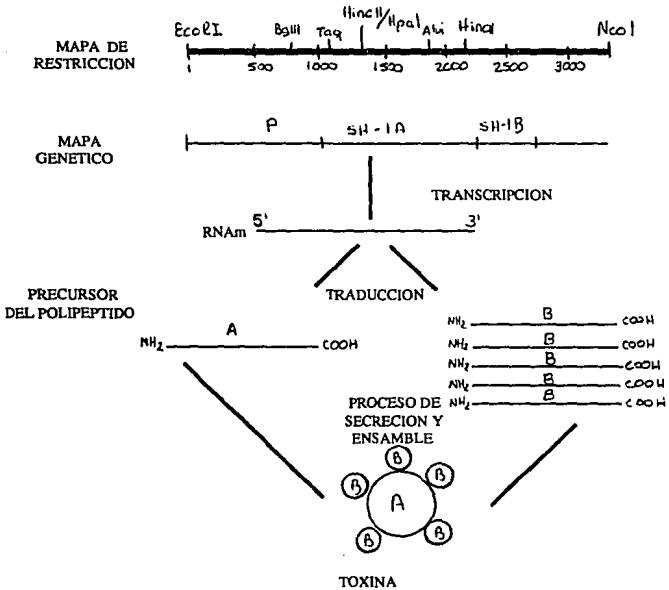
Brown y cols. en 1989 realizaron pruebas de hibridación con *E. coli* productoras de SLT-I, SLT- II y SLT-IIv y oligonucleótidos sintéticos elaborados a partir de secuencias de nucleótidos que codifican para la subunidad A y B de SLT-I y SLT-II. Este estudio se realizó con la finalidad de identificar cepas *E. coli* productoras de diferentes tipos de SLT. Las pruebas de hibridación se realizaron a 45°C y 53°C y se concluyó que la prueba de hibridación con oligonucleótidos a 53°C puede diferenciar aislamientos entre SLT-II y SLT-IIv, también observaron que existen diferentes nucleótidos entre la posición 1013 a la 1032 de la secuencia que codifican para la subunidad A de SLT- I y SLT -II (5, 33)

Un estudio completo de evidencias genéticas para fines de fagotipificación fué publicado en 1987 por O' Brien ; este estudio ha sido la base de muchas investigaciones en cuanto a modelos genéticos se refiere (50). Los fagos originalmente designados H19 A y H19J se relacionan con el fago 933J de la cepa 933 en términos de morfología , cadena polipeptídica, fragmentos de DNA de restricción e inmunidad específica, siendo diferente el fago H19B en cuanto a esta última característica. (56).

Toth y cols. en 1991 realizaron pruebas de ELISA para determinar los productos del plásmido de 60MDa de *E. coli* serotipo O:157H:7. En este estudio se identificaron 2 proteínas de 82 y 92 KDa presentes en cepas de *E. coli* con plásmidos de 60 -MDa. La prueba de

FIGURA No. 2

Organización y expresión del operon de SLT - I



El análisis de las clonas y subclonas de DNA del fago 933J en celulares y del fago H 19B en un sistema de síntesis de proteínas proporcionaron una evidencia directa de que los genomas del fago codifican para SLT - I, esto permite asignar la localización en la secuencia continua que codifica los polipéptidos A y B, y proporciona una evidencia en la orientación de la transcripción (50).

ELISA también determinó proteínas similares en cepas de *E. coli* productoras de SLT y que pertenecen a serotipos diferentes al O:157H:7 (3).

Todos estos estudios han dado origen a la estandarización de ensayos genéticos como: , clonación de genes para la producción de SLT , prueba de la mancha o " colony blot ", detección de anticuerpos monoclonales y PCR, para la identificación e investigación de cepas EPEC y EHEC relacionadas con la producción de citotoxinas (82, 83).

VI. JUSTIFICACION

La frecuencia de diarrea en México y la creciente evidencia de que las cepas de *E. coli* productoras de citotoxinas se encuentran asociadas a cuadros diarreicos relacionados con SUH y CH, son el motivo de un estudio en muestras fecales obtenidas de casos de diarrea en infantes, de viajeros y de muestras de alimentos, con la finalidad de verificar si están involucradas cepas de *E. coli* productoras de citotoxinas .

El presente trabajo puede contribuir a ubicar a las cepas de *E. coli* productoras de citotoxinas entre los agentes etiológicos causantes de cuadros diarreicos en la población mexicana asociados al consumo de alimentos, aspecto hasta el momento no reportado en México y auxiliar en el tratamiento efectivo, al ensayar métodos de diagnóstico rápidos que ayuden a prevenir complicaciones como SUH y CH y descartar agentes etiológicos no bacterianos asociados con estos síndromes.

VII. OBJETIVO GENERAL

Aislar y caracterizar cepas de *E. coli* obtenidas a partir de carne molida cruda, hamburguesas y muestras de heces provenientes de un brote de diarrea del viajero con la finalidad de verificar su comportamiento bioquímico, grupo serológico y producción de citotoxinas en un sistema de cultivo celular Vero y comparar éstas expresiones fenotípicas con las obtenidas en 50 cepas de *E. coli* seleccionadas del cepario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

VIII. OBJETIVOS PARTICULARES

Estimar el contenido de coliformes en muestras de carne molida cruda y hamburguesas utilizando el método de número más probable.

Aislar e identificar cepas de *E. coli* a partir de carne molida cruda, hamburguesas y muestras de heces provenientes de un brote de diarrea del viajero, utilizando pruebas bioquímicas en tubo y por el sistema API-20 para enterobacterias.

Caracterizar cepas EHEC mediante pruebas de sorbitol en tubo, placa y microplaca.

Determinar el antígeno somático mediante pruebas serológicas en tubo.

Realizar pruebas de citotoxicidad en cultivo celular a cepas *E. coli* reportadas como sorbitol negativo.

IX. MATERIAL , MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

EQUIPO

Estufa a 37°C
Microscopio invertido
Horno
Autoclave
Centrifuga clínica
Microcentrífuga
Balanza granataria
Balanza analítica
Liofilizadora
Soplete
Jarra de anaerobiosis
Micropipetas

MATERIAL DE VIDRIO

El usual en un laboratorio de Bacteriología médica.

MATERIAL DE PLASTICO

Microplacas de 96 pozos
Puntas estériles.

MEDIOS DE CULTIVO

Gelosa MacConkey
Gelosa MacConkey - sorbitol
GE
BAB
SS
TCBS
AST
Caldo tetrionato
Caldo lactosado
Caldo verde brillante bilis al 2%
CST
Medio M-199 (Con sales Earle) sin bicarbonato con L- Glutamina.

PRUEBAS BIOQUIMICAS DIFERENCIALES

TSI
LIA
MIO
CIT
RM - VP
UREA
SOR-T
SOR-MP
Sistema API - 20 para enterobacterias.

SOLUCIONES

SSF al 0.85% estéril
Formalina
Regulador de fosfatos (PBS)
Tripsina 0.05%
Bicarbonato de sodio 4.4%
Verseno (EDTA + PBS) 0.05%
Penicilina y estreptomicina (PES), a una concentración final de 1000,000 UI / ml y 100 mcgs / ml respectivamente.
Suero fetal bovino al 10%
Suero glucosado
Lincomicina (100 ug / ml)
Polimixina B (10,000 UI / ml)
Colorante de Giemsa

REACTIVOS

Metanol
N, N, N', N' - tetrametil parafenilendiamina.
H₂O 30%
 α - Naftol 10%
KOH 40%
Cloruro férrico 10%
Diclorhidrato de p-aminodifenilbenzaldehido
Rojo de metilo
 α - Naftil amina

X. MUESTRAS MATERIAL BIOLÓGICO Y CEPAS DE REFERENCIA

MUESTRAS:

50 Cepas *E. coli* seleccionadas del cepario de la ENCB-IPN .
23 hisopos rectales provenientes de Campeche (brote de diarrea del viajero)
10 muestras carne molida cruda recolectadas en el Rastro de Atzacapozalco.
10 muestras de hamburguesas obtenidas en diferentes puestos ambulantes y comercios establecidos.

LINEA CELULAR

Células de riñón de mono verde africano. (Vero)

CONTROLES

E. coli 933J (VT-1 positiva)
E. coli 933W (VT-2 positiva)
E. coli VT-1 y VT-2 negativa
E. coli H10407 (LT positiva)
E. coli H:30 (VT-1 y VT-2 positiva)
E. coli O:157H:7

ANTISUEROS SOMÁTICOS :

O: 6
O: 8
O: 15
O: 20
O: 25
O: 26
O: 27
O: 63
O: 78
O: 111
O: 126
O: 148
O: 157

XI. METODOLOGIA

11.1 Estimación de coliformes en muestras de alimentos por el método de NMP Prueba Presuntiva y Confirmatoria.

Con base en las normas de control sanitario de los Estados Unidos de Norteamérica se realizó un ensayo de estimación del contenido de coliformes prueba presuntiva y confirmatoria en 10 muestras de carne molida cruda obtenidas en diferentes puestos del rastro de Atzacapozalco y en 10 muestras de hamburguesas recolectadas en diversos expendios públicos y restaurantes de comida rápida (2).

La prueba presuntiva consistió en inocular 1 ml de 3 diluciones diferentes (1:10, 1:100 y 1:1000) de la muestra , en una serie de 9 tubos de caldo lactosado con tubos Durham invertidos, los cuales sirvieron como dispositivo indicador de la presencia del gas que se formó como producto de la utilización del carbohidrato. Los tubos se incubaron a 37°C de 18 - 24 h y después de la incubación a todos los tubos con evidencia de gas, se les realizó la prueba confirmatoria utilizando 10 ml de caldo verde brillante bilis al 2% con tubos Durham invertidos. En la prueba confirmatoria los tubos se incubaron de 18 - 24 h y se dio como positivos los que presentaron gas (Diagrama No. 1). De acuerdo al número de tubos y dilución, los resultados se buscaron en tablas de MacCray (Apéndice B.5) y los resultados se reportaron en UFC / g de muestra de alimentos.

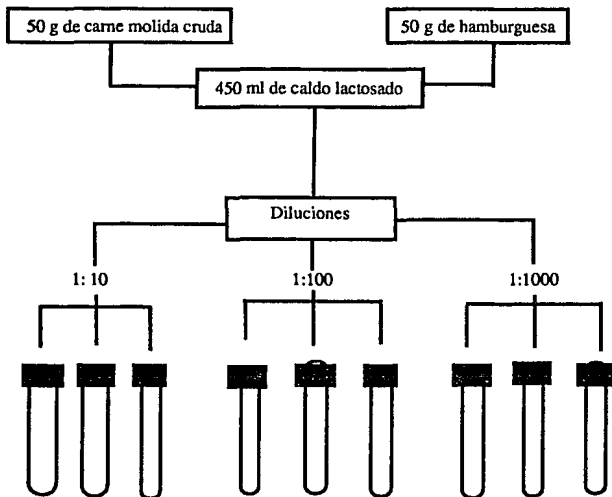
11.2 Aislamiento de *E. coli* y otros enteropatógenos

11.2.1 de alimentos

En el monitoreo de alimentos se trabajaron 10 muestras CM y 10 muestras de H . Para procesar las muestras se siguió la rutina de trabajo ilustrada en el Diagrama No. 2. Se pesaron 50 g de cada muestra y se realizó una dilución 1:10 en caldo lactosado. Si la muestra de hamburguesa pesaba menos de 50 g, se ajustó la cantidad de caldo para no cambiar las

DIAGRAMA No. 1

Estimación del contenido de coliformes en muestras de alimentos por el método de NMP.



Nota: La prueba confirmatoria se realizó, utilizando verde brillante bislis al 2%, inoculando 2 asadas a partir de los tubos con caldo lactosa en los cuales se observó presencia de gas (Prueba presuntiva)

condiciones de trabajo. Las muestras se homogenizaron en licuadora y se sembró 0.1 ml de cada una en agar MacConkey

Las suspensiones y las placas se incubaron a 37°C de 18 - 24 h. Después del periodo de incubación nuevamente se tomó 0.1 ml de la muestra y se sembró en agar MacConkey.

Por cada muestra se recuperaron 8 colonias lactosa positiva y 2 lactosa negativa con morfología colonial diferente. Cada cepa se purificó y se sembró en tubos de BAB o GE para conservarlas (Apéndice B.1)

11.2.2 de heces de un brote de diarrea del viajero

En el Diagrama No. 3 se presenta la rutina de trabajo utilizada en el estudio de 23 muestras diarreicas provenientes del estado de Campeche . Las muestras se sembraron en : agar MacConkey , TCBS y caldo tetrionato. Las placas con agar se sembraron por estría cruzada con dilución y el caldo tetrionato se inoculó colocando el hisopo dentro de el tubo y la incubación se realizó a 37°C de 36 - 48 h, después del periodo de incubación a partir del caldo tetrionato se resembró en agar verde brillante y sulfito de bismuto.

Las placas se revisaron y se picaron 5 colonias lactosa positiva y 2 negativa, las cepas se purificaron y se conservaron en tubos de BAB o GE (Apéndice B.1).

11.3 Identificación de *E. coli* y otros enteropatógenos.

11.3.1 por pruebas diferenciales en tubo

Se trabajaron 50 cepas de *E. coli* provenientes de un estudio de niños con y sin diarrea hospitalizados en Pediatría del Centro Médico Nacional del IMSS. Las cepas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Bacteriología Médica de la Sección de Graduados de la ENCB-IPN. Las cepas se purificaron en agar MacConkey y el procedimiento de laboratorio para la identificación se llevó a cabo de acuerdo al Diagrama No. 4 , utilizando el sistema convencional de bioquímicas en tubo : TSI, LIA, CIT, RM, VP, URE y MIO

DIAGRAMA No. 2

Aislamiento de *E. coli* y otros enteropatógenos a partir de alimentos:
carne molida cruda y hamburguesas

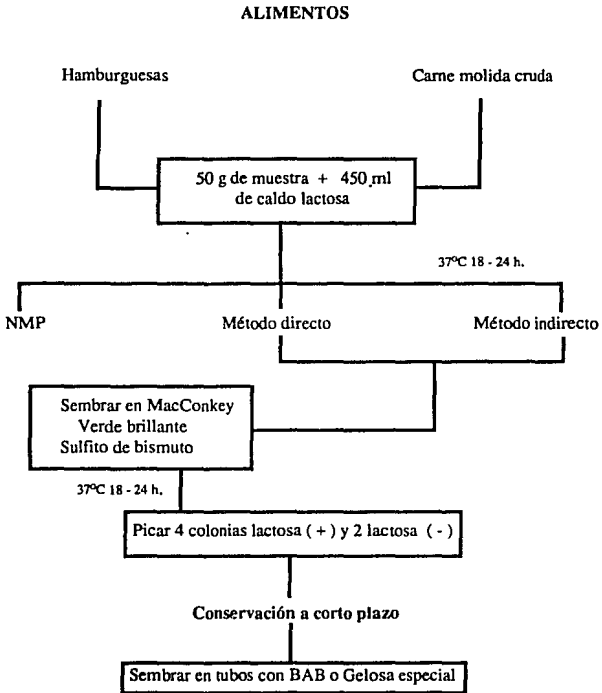


DIAGRAMA No. 3

Aislamiento de *E. coli* y otros enteropatógenos a partir de heces provenientes de un brote de diarrea del viajero (Campeche)

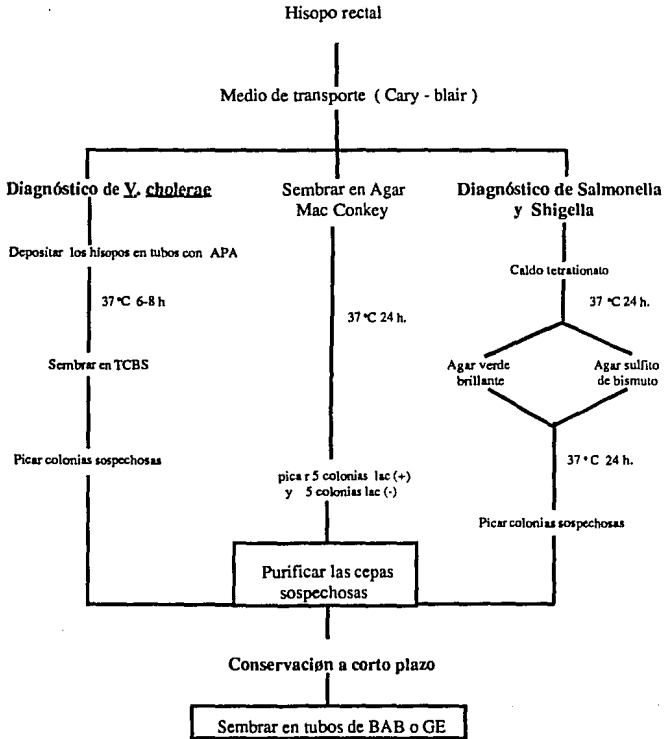
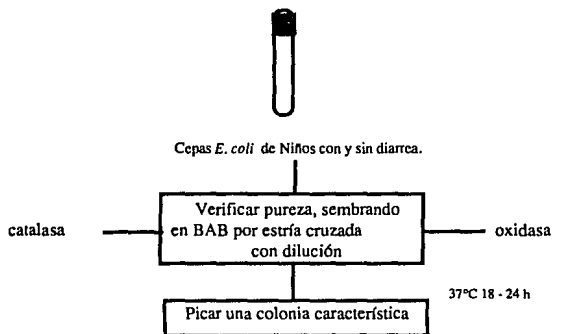
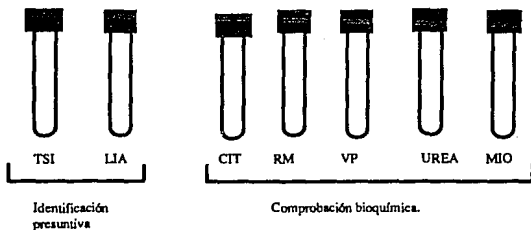


DIAGRAMA No. 4

Pruebas bioquímicas en tubo para la confirmación de cepas de *E. coli*



Pruebas Bioquímicas



CONSERVACION



11.3.2 por microsistema API-20 para enterobacterias

Se trabajaron 280 cepas bacterianas para ser identificadas por el sistema API-20 para enterobacterias, 250 provenían de alimentos y 30 de un brote de diarrea del viajero.

Siguiendo la rutina descrita en el Diagrama No. 5, se prepararon suspensiones bacterianas utilizando 5 ml de SSF estéril.

Los microtubos de la tira reactiva se llenaron hasta la mitad del tubo y solamente para las pruebas de CIT, VP y GEL la suspensión se llevó hasta la cúpula. Para las pruebas de descarboxilación de aminoácidos, URE y producción de ácido sulfhídrico se llenó la cúpula con vaselina estéril.

El sistema API-20 se incubó a 37°C de 18 a 24 h, después del tiempo de incubación, se revisa la tira si la glucosa y otras 3 pruebas más daban positivas sin que se les haya agregado reactivo, se considera que la tira puede leerse y se adicionan los reactivos, se leen los resultados y se interpreta el código obtenido utilizando el Manual API-20. En el caso de que la glucosa y otras 3 pruebas permanezcan negativas la tira es reincubada otras 24 h a 37°C y se añaden las siguientes pruebas: O-F, nitratos, motilidad y crecimiento en MacConkey.

11.4 Pruebas de fermentación de sorbitol en tubo, placa y microplaca.

March y cols en 1986 y Karmali y cols (1989) utilizaron agar MacConkey con sorbitol para el aislamiento e identificación de *E. coli* O:157H:7. De acuerdo a estos antecedentes y con la finalidad de recuperar el serotipo O:157H:7 y otros con esta característica se muestrearon 104 cepas *E. coli*.

La rutina de trabajo se llevó a cabo de acuerdo al Diagrama No. 6. El ensayo de fermentación de sorbitol se realizó por 3 métodos diferentes: tubo, placa y microplaca. En los dos primeros sistemas se utilizó como indicador rojo de fenol y en el último indicador

DIAGRAMA No. 5

Identificación de cepas bacterianas por pruebas miniaturizadas (Sistema API-20 para enterobacterias)

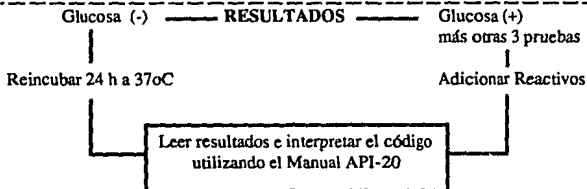
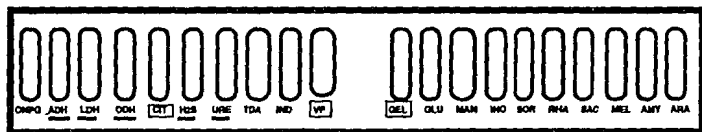
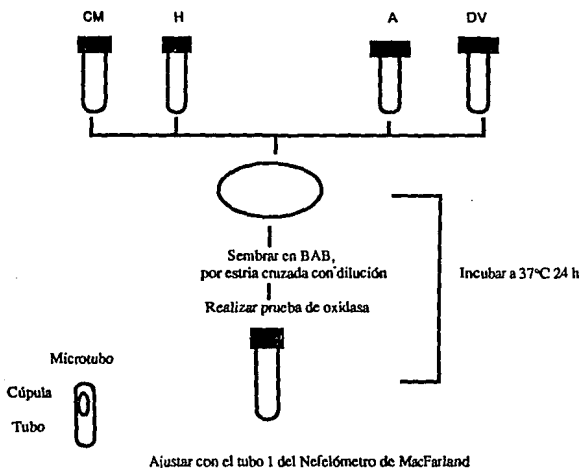
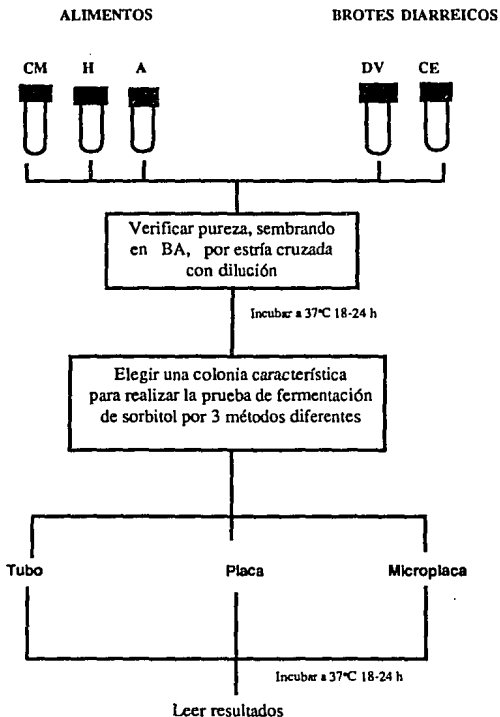


DIAGRAMA No. 6

Pruebas de fermentación de sorbitol en tubo, placa y microplaca.



de Andrade. La prueba de fermentación de sorbitol se realizó por la acción del medio y el consecuente cambio de pH y vire del indicador.

11.5 Pruebas serológicas.

Se realizó la caracterización serológica a 104 cepas de *E. coli*. De acuerdo a el Diagrama No. 7 las cepas se sembraron en agar MacConkey y después del período de incubación se eligió una colonia lisa y se sembró en medio de BAB por estría cruzada con dilución; las placas se incubaron de 18 - 24 h a 37°C y se seleccionaron por observación directa en microscopio esteroscópico 3 colonias con borde liso y delimitado y se sembraron en 10 ml de CST de 4 - 6 h a 37°C para posteriormente realizar un tratamiento con vapor fluyente (2 - 3 lbs de presión, 1 h), con este tratamiento se eliminan la cápsula y los flagelos para dejar intacta la pared celular. Después del tratamiento las muestras se refrigeraron toda la noche, para favorecer la sedimentación celular.

Cuando se observó formación de malla en la parte inferior del tubo las cepas se descartaron por ser rugosas, la malla se forma por la aglutinación de las paredes celulares bacterianas rotas.

Para la tipificación serológica se emplearon 0.9 ml del sobrenadante de las cepas formadoras de botón (pared celular intacta) y 0.1 ml de una dilución 1:1000 de los antisueros somáticos: O:6, O:8, O: 15, O:20, O: 25, O: 26, O: 27, O: 63, O: 78, O: 111, O: 126, O:148 y O: 157.

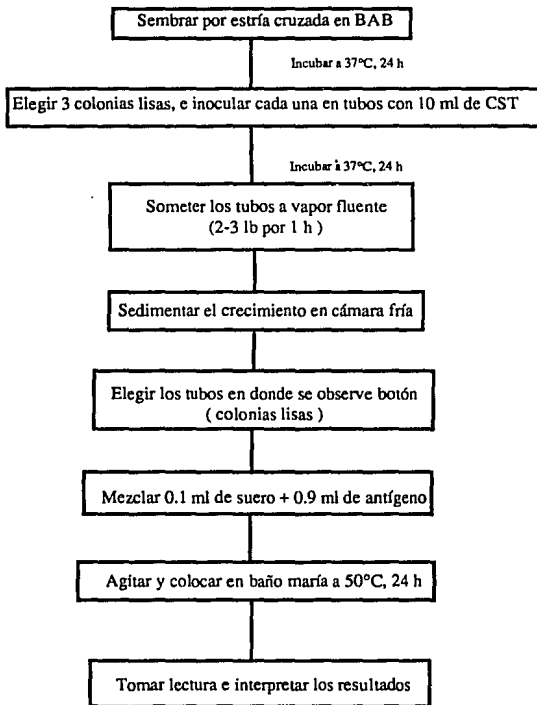
En la prueba se utilizaron los siguientes controles: Control de cada suero y un control negativo.

Los resultados se reportaron de acuerdo a la siguiente relación:

Presencia de botón:	Antisero no correspondiente.
Presencia de malla:	Antisero correspondiente.

DIAGRAMA No. 7

Serotipificación de cepas *E. coli*



11.6 Pruebas de citotoxicidad en cultivo celular VERO.

Este tipo de pruebas se describieron inicialmente por Konowalchuck en 1977 al determinar la actividad biológica en cultivo celular de toxinas termolábiles diferentes a LT (38).La secuencia del ensayo de citotoxicidad se ilustra en el Diagrama No. 8.

11.6.1 Preparación del sobrenadante.

La obtención de las toxinas se realizó utilizando CST de acuerdo a la metodología descrita por Chart y Scotland en 1987 (8). Las 104 cepas de *E. coli* conservadas en GE se sembraron en tubos con 5 ml de CST y se incubaron a 37°C por 4 h. De este cultivo se tomó 0.1 ml para inocular tubos con 2 ml de CST y 0.1 ml de Lincomicina (100 ug/ml) y los tubos se incubaron a 37°C toda la noche. Con la finalidad de obtener toxinas libres de bacterias las muestras se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante obtenido se recentrifugo a 12,000 rpm durante 10 min (sobrenadante A). El paquete celular obtenido se lava con 2 ml de PBS estéril y se centrifuga a 2500 rpm durante 5 minutos. Posteriormente el botón se resuspende en 0.4 ml de PBS estéril y se adiciona 0.2 ml de sulfato de polimixina B 10,000 UI/ml (14). Los tubos se incubaron a 37°C durante 10 minutos y después se centrifugaron a 12000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante obtenido fue empleado para determinar la presencia de toxinas LT y/o VT (sobrenadante B), utilizando línea celular VERO en microplacas de 96 pozos. Los sobrenadantes que no se utilizaron inmediatamente para el ensayo se conservaron en congelación a - 70°C durante 3 semanas.

11.6.2 Preparación de la microplaca de 96 pozos con células VERO.

Se utilizaron 6 microplacas de 96 pozos y una de 24 con aproximadamente 18 000 células por pozo.

Las microplacas fueron preparadas de acuerdo a la siguiente metodología:

A una botella de 75 ml con cultivo celular confluyente de células VERO se le retiro el medio de cultivo por el lado contrario a la monocapa y se le adicionó 2 ml de una mezcla de tripsina-

verseno al 0.25% para lavarla , se eliminó y posteriormente se adicionó 1.2 ml del mismo reactivo y se dejó actuar 2 minutos a 37°C. Las células desprendidas se suspendieron en 2 ml de MEM con 10% de SFT y se tomó 0.1 ml del cultivo celular para hacer una cuenta viable con 0.9 ml de azul de tripano, según lo descrito en el Apéndice B.3.2

Ajustada la suspensión para obtener una concentración de 100000 células por ml, se distribuyó en la microplaca adicionando 0.180 ml por pozo y se incubó a 37°C por 24 h. Después este periodo se observó la confluencia de la monocapa por cada pozo y se utilizaron aquellos pozos que tenían entre 90 - 100% de confluencia.

11.6.3 Ensayo de citotoxicidad.

En el ensayo se utilizaron 4 microplacas, a las que se les cambió el medio de cultivo por MEM al 2% de SFT y se inocularon 0.010 ml del sobrenadante A y 0.010 ml del sobrenadante B por pozo . El ensayo se realizó por duplicado y se incluyeron los siguientes testigos:

- a) Testigo positivo para VT.- Sobrenadante de cultivo de las cepas 933J, 933W y H:30, los sobrenadantes de acuerdo a la cepa fueron inoculados en pozos diferentes.
- b) Testigo positivo para LT.- Sobrenadante de cultivo de la cepa H10407 .
- c) Testigo Negativo.- Sobrenadante de cultivo de una cepa incapaz de producir LT o VT.
- d) Testigo del medio de crecimiento de la cepa bacteriana.- Pozo con cultivo de células más CST para descartar su toxicidad.
- e) Testigo del antibiótico.- Medio de CST más lincomicina
- f) Testigo de las células.- Pozo con monocapa de células y medio de cultivo para células .

Las microplacas se incubaron a 37°C .

11.6.4 Interpretación

Las lecturas se realizaron a las 3, 6, 24, 48, 72 y 96 h. La observación se hizo en microscopio invertido con el objetivo de 10X. Los resultados positivos para LT y / o VT se reportaron de acuerdo a las condiciones de las células inoculadas con los sobrenadantes de los testigos y al siguiente criterio:

EFEECTO	OBSERVACION	TIEMPO
Citotónico reversible	células alargadas	6 - 24 h
Citotóxico irreversible	células redondeadas " lisis celular "	24 - 96 h.

11.7 Prueba de la mancha con sonda LT no radioactiva marcada con digoxigenina.

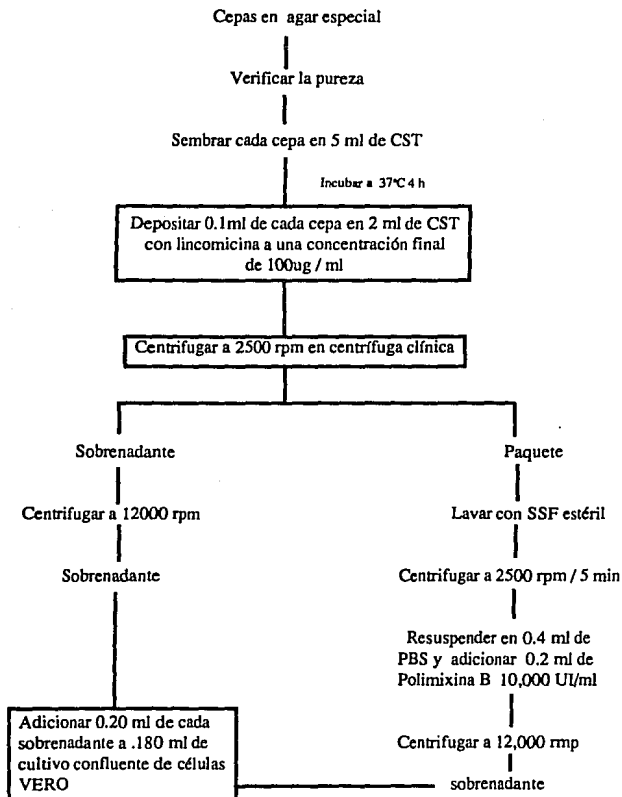
A principios de la década de los años 80 se comenzaron a usar técnicas de biología molecular empleando sondas de DNA que determinan secuencias específicas en el material genético y que ponen de manifiesto fragmentos de DNA que codifiquen para una propiedad en especial, por ejemplo la subunidad A de la toxina LT. Los ensayos de hibridación se fundamentan principalmente en la característica de complementariedad que existe entre las cadenas de DNA de los ácidos nucleicos (25, 73).

1.7.1 Preparación de prueba de la mancha o prueba de la mancha .

Con la finalidad de verificar si existía alguna huella genética relacionada con la toxina LT se estudiaron 104 cepas de *E. coli* por la técnica de la mancha utilizando sonda no radioactiva.

DIAGRAMA No. 8

Pruebas de citotoxicidad en cultivo de células VERO



De acuerdo al Diagrama No. 9 de trabajo las cepas se sembraron en agar Luria utilizando una cuadrícula para organizar las colonias. Las placas se incubaron de 4 - 6 h a 37°C. Después de este periodo se colocaron sobre las placas filtros de nylon de 8 cm y se reincubaron a 37°C toda la noche.

Las colonias adheridas a los filtros de nylon se lisaron con NaOH 0.5 M impregnado en papel filtro sobre el que se colocaron por 15 minutos con las colonias hacia arriba. Siguiendo lo descrito en el diagrama No. 9, las membranas se saturaron con Tris 1.0 M pH 8 y posteriormente con Tris 1.0 pH 8 / NaCl 1.5 M durante 10 minutos cada proceso con la finalidad de neutralizar. Posteriormente los filtros se enjuagaron en una solución de SSC 2X, se transfirieron a papel filtro y se secaron a temperatura ambiente. Por último se colocaron en un horno a 80°C por 2 h y se guardaron en cajas Petri desechables hasta la hibridación.

11.7.2 Hibridación

Para realizar el proceso de hibridación, los filtros se colocaron en bolsas de plástico, se agregaron 10 ml de solución pre-hibridante y se incubaron a 65°C por 1 hr en baño de agua con agitación.

Aproximadamente 15 minutos antes del término del tiempo de pre-hibridación, se preparó la sonda en tubos de microcentrifuga diluyendo de 2 - 5 μ l de sonda en 100 μ l de agua, dependiendo de su concentración. Los tubos se colocaron 10 minutos en baño de agua a ebullición y luego se pasaron a hielo, posteriormente se centrifugaron 12,000 rpm. La sonda se dejó en hielo hasta su utilización.

Los filtros se sacaron del baño de agua, se removió la solución prehibridante y se agregó 2.5 ml de solución hibridante y sonda. El proceso de hibridación se llevó a cabo a 65°C en baño

de agua con agitación. Al día siguiente se preparó la solución de lavado, los filtros se sacaron de la bolsa de plástico, se colocaron en cajas de vidrio y se agregó 100 ml de la solución de lavado enjuagando rápidamente. Este proceso se repitió 3 veces utilizando 200 ml de la misma solución y se lavó el filtro 65°C en baño de agua por agitación por 15 minutos.

11.7.3 Revelado de la membrana

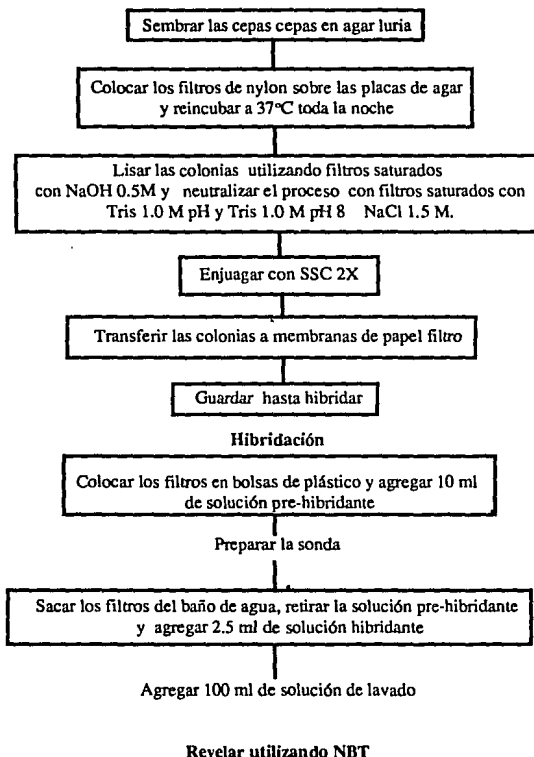
Los filtros se enjuagaron por un minuto con 40 ml de la solución A. Retirada la solución anterior se agregó 40 ml de buffer A más leche descremada al 5%, este proceso duró 3 h en condiciones de agitación. Posteriormente se agregó 10 ml de la solución A más leche descremada al 5% y 3 μ l de un conjugado de anticuerpos digoxigenina, se mezclaron los componentes y se dejó el conjugado por 30 minutos.

Los filtros se lavaron con 40 ml de buffer A en condiciones de agitación por 15 minutos, esta operación se realizó 2 veces, después los filtros se removieron dejando escurrir el exceso de solución y se enjuagaron con 40 ml de buffer C por 2 minutos en condiciones de agitación.

Los filtros se colocaron en cajas Petri que contenían 10 ml de buffer C y se agregó 45 μ l de NBT y 35 μ l de BCIP, se agitó bien, se sellaron las cajas y se guardaron en la oscuridad durante unas horas o toda la noche. Al día siguiente se realizó la lectura comparando con los controles.

DIAGRAMA No. 9

Prueba de la mancha con sonda LT no radiactiva



XIII. RESULTADOS

De acuerdo con los objetivos planteados se estimó el contenido de coliformes en 10 muestras de carne molida cruda recolectadas en el Rastro de Atzacapozalco y en 10 muestras de hamburguesas provenientes de puestos públicos y de establecimientos de comida rápida. En la Tabla No. 10 se presentan los resultados de la estimación del contenido de coliformes en CM y H y se observa que hubo un promedio de más de 1,100 UFC por gramo de carne molida y 250 UFC por gramo de hamburguesa, esto indica que todas las muestras monitoreadas estaban contaminadas por coliformes. En la Tabla No. 11 se presenta el contenido de coliformes por muestra de CM y H con respecto a su origen y presencia de *E. coli*; de acuerdo a los resultados se aprecia que en todas las muestras de CM se obtuvieron cultivos positivos para *E. coli* con más de 11×10^4 UFC de coliformes por muestra total; con respecto a las muestras de H solamente en 3 (30%) se aislaron cepas de *E. coli* con un promedio de 1.3×10^4 UFC de coliformes por muestra total, de estos aislamientos 2 correspondieron a muestras provenientes de expendios públicos de hamburguesas (H-1 y H-7) y uno de una lonchería: H-2.

En la Tabla No. 12 y en la Gráfica No. 1 se muestra la relación porcentual de los enteropatógenos aislados de las 10 muestras de CM y H; en el análisis de estos datos se puede observar que se aislaron 100 cepas provenientes de CM y 50 de H de las cuales 25 (25%) y 9 (18%) correspondieron a *E. coli* respectivamente, también se aprecia el porciento de aislamientos de otros enteropatógenos de interés clínico como: *Pseudomonas* sp. 6 (6%), *Aeromonas hydrophila* 4 (4%), *V. fluvialis* o *V. vulnificus* 5 (5%) y 1 (1.0%) cepa de *Shigella sonnei*. En cuanto a enteropatógenos aislados de H en la Tabla No. 12 y en la Gráfica No. 2 se muestra que la cantidad de cepas correspondientes a coliformes fué menor que la encontrada en CM, observándose que *Klebsiella* sp se aisló con mayor frecuencia 16 (32%) y solamente se aislaron 6 (12%) cepas de *Pseudomonas* sp.

TABLA No. 10

**Estimación del contenido de coliformes en alimentos,
por el método de NMP.**

ALIMENTOS

Carne molida cruda

Muestra	UFC / g
CM-1	+ 1,100
CM-2	+ 1,100
CM-3	+ 1,100
CM-4	+ 1,100
CM-5	+ 1,100
CM-6	+ 1,100
CM-7	+ 1,100
CM-8	+ 1,100
CM-9	+ 1,100
CM-10	+ 1,100

X = + 1,100 UFC / g

Hamburguesas

Muestra	UFC / g
H-1	9.2
H-2	240
H-3	+ 1,100
H-4	3.0
H-5	+ 1,100
H-6	20
H-7	15
H-8	3.0
H-9	6.1
H-10	6.0

X = 250 UFC / g

TABLA No. 11

Relación del contenido de coliformes por muestra total de CM y H con respecto a su origen y aislamientos positivos para *E. coli*.

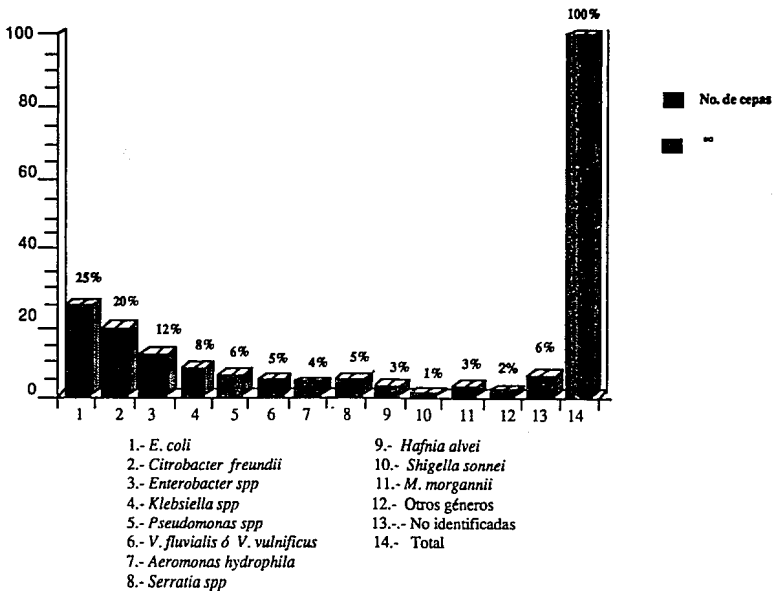
Muestra	Origen	Cantidad por muestra total	UFC	Aislamiento positivo para <i>E. coli</i>
CM-1	Rastro de Atzacapozalco	100 g	+ 11 x10 ⁴	+
CM-2	Rastro de Atzacapozalco	100 g	+ 11 x10 ⁴	+
CM-3	Rastro de Atzacapozalco	100 g	+ 11 x10 ⁴	+
CM-4	Carnicería Col. Granjas	100 g	+ 11 x10 ⁴	+
CM-5	Carnicería Av. Granjas 746	100 g	+ 11 x10 ⁴	+
CM-6	Carnicería " Super carnes"	100 g	+ 11 x10 ⁴	+
CM-7	Carnicería Gaby	100 g	+ 11 x10 ⁴	+
CM-8	Rastro de Atzacapozalco	100 g	+ 11 x10 ⁴	+
CM-9	Rastro de Atzacapozalco	100 g	+ 11 x10 ⁴	+
CM-10	Rastro de Atzacapozalco	100 g	+ 11 x10 ⁴	-
		x 100 g	+ 11 x10 ⁴	
H-1	Puesto público	50 g	455	+
H-2	Lonchería Gaby	76 g	18240	+
H-3	Comedor FES-C	57 g	+ 62700	-
H-4	MacDonald	30.9 g	- 92.7	-
H-5	Burger-boy	47 g	+ 51700	-
H-6	Puesto público	74.1 g	1482	-
		x 58.4g	13576.7	

TABLA No. 12

Porcentaje de *E. coli* y otros enteropatógenos aislados de 10 muestras de CM y 10 muestras de hamburguesas.

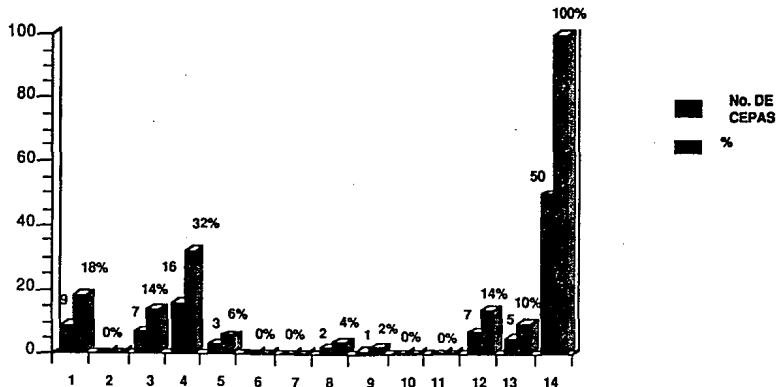
Bacterias	CM		H	
	No.	%	No.	%
<i>E. coli</i>	25	(25.0)	9	(18.0)
<i>Citrobacter freundii</i>	20	(20.0)	0	(0.0)
<i>Enterobacter</i>	12	(12.0)	7	(14.0)
<i>Klebsiella</i>	8	(8.0)	16	(32.0)
<i>Pseudomona</i>	6	(6.0)	3	(6.0)
<i>V. fluviales</i> ó <i>V. vulnificus</i>	5	(5.0)	0	(0.0)
<i>Aeromonas hydrophilas</i>	4	(4.0)	0	(0.0)
<i>Serratia</i>	5	(5.0)	2	(4.0)
<i>Hafnia alvei</i>	3	(3.0)	1	(2.0)
<i>Shigella sonnei</i>	1	(1.0)	0	(0.0)
<i>Morganella morganni</i>	3	(3.0)	0	(0.0)
Otras géneros	2	(2.0)	7	(14.0)
No identificadas	6	(6.0)	5	(10.0)
Total de cepas	100	(100.0)	50	(100.0)

Distribución porcentual de enteropatógenos aislados de 10 muestras de CM



GRAFICA No. 2

Distribución porcentual de enteropatógenos aislados de 10 muestras de H



- | | |
|--|-----------------------------|
| 1.- <i>E. coli</i> | 9.- <i>Hafnia alvei</i> |
| 2.- <i>Citrobacter freundii</i> | 10.- <i>Shigella sonnei</i> |
| 3.- <i>Enterobacter spp</i> | 11.- <i>M. morgannii</i> |
| 4.- <i>Klebsiella spp</i> | 12.- Otros géneros |
| 5.- <i>Pseudomonas spp</i> | 13.- No identificadas |
| 6.- <i>V. fluvialis</i> ó <i>V. vulnificus</i> | 14.- Total |
| 7.- <i>Aeromonas hydrophila</i> | |
| 8.- <i>Serratia spp</i> | |

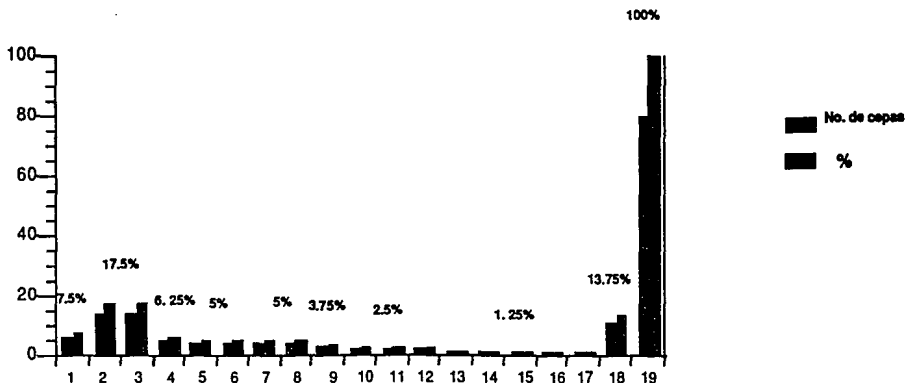
Se estudiaron además 78 cepas proporcionadas por el laboratorio de Bacteriología Entérica del INDRE , cuyas muestras fueron tratadas de origen según la rutina de trabajo para el aislamiento de *V. cholerae* O1, dichas cepas se identificaron por el sistema API-20 para enterobacterias y provienen de diversos alimentos como: pescado, mariscos y carne de cerdo. Dos de las cepas incluidas en este grupo se aislaron de hamburguesas y fueron enviadas al INDRE por un laboratorio de Salud Pública perteneciente a la Red, para la identificación de *E. coli* O:157H7. Los resultados de la identificación bacteriana de las 78 cepas se ilustra en la Gráfica No. 3 y se observa que *Klebsiella oxytoca* y *Enterobacter* spp se aislaron con mayor frecuencia, recuperándose un 17.5% de ambas enterobacterias. El porcentaje de recuperación para *E. coli* fué del 7.5%; los datos de la gráfica se indica también el porcentaje de aislamiento de otros enteropatógenos : *V. alginoliticus* 6.5%, *V. parahaemolyticus* 5%, *Yersinia enterocolitica* 3.75%, *V. cholerae* no O1 2.5% y *V. fluvialis* 1.25%

En la Tabla No. 13 se presenta un análisis por edad y sexo de 23 personas que presentaron diarrea (brote de diarrea del viajero); la identificación del agente causal fué orientada al aislamiento de *V. cholerae* O1 y a otros enteropatógenos de interés clínico como: *E. coli*, *Salmonella* sp y *Shigella* sp. Del total de las muestras 14 (60.8%) provienen de mujeres y 9 (32.2%) de hombres, el 56.5% de los casos correspondían a niños menores de 5 años con una frecuencia del 30.4% de aislamientos positivos para *E. coli*.

En la Tabla No. 14 se presenta el porcentaje de aislamientos de los enteropatógenos recuperados de 23 muestras fecales del brote de diarrea del viajero ocurrido en Campeche, de este brote se recuperaron 30 cepas bacterianas y la bacteria aislada con mayor frecuencia fué *E. coli* con 14 (46.7 %) aislamientos y en orden decreciente se aislaron *Morganella morganii* 5 (16.7%) y *Pseudomonas* spp; *V. cholerae* O1, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *Aeromonas hydrophila* , estas bacterias se aislaron con una del 3.3%

Distribución porcentual de microorganismos identificados

a partir de cepas provenientes de alimentos



- 1.- *E. coli*
- 2.- *Klebsiella oxytoca*
- 3.- *Enterobacter spp*
- 4.- *V. alginolyticus*
- 5.- *Citrobacter freundii*
- 6.- *Morganella morgannii*
- 7.- *Providencia*
- 8.- *V. parahaemolyticus*
- 9.- *Yersinia enterocolitica*
- 10.- *V. cholerae no O1*

- 11.- *Serratia*
- 12.- *Proteus mirabilis*
- 13.- *Ples. shigelloides*
- 14.- *E. hermannii*
- 15.- *V. fluvialis*
- 16.- *Hafnia alvei*
- 17.- *Edwardsiella*
- 18.- No identificadas
- 19.- Total

TABLA No. 13

Distribución de aislamientos de *E. coli* por edad y sexo de 23 muestras de diarrea del viajero recolectadas en Campeche.

Muestra	Edad	Sexo	Aislamiento de <i>E. coli</i>
1	7 años	Femenino	Positivo
2	2 años	Masculino	Positivo
3	25 años	Masculino	Negativo
4	1 año	Femenino	Negativo
5	3 años	Masculino	Negativo
6	4 años	Masculino	Positivo
7	3 años	Femenino	Positivo
8	57 años	Femenino	Positivo
9	19 años	Masculino	Negativo
10	6 años	Masculino	Negativo
11	1 año	Femenino	Negativo
12	9 años	Femenino	Negativo
13	4 años	Masculino	Negativo
14	40 años	Femenino	Positivo
15	15 meses	Masculino	Negativo
16	2 años	Masculino	Positivo
17	86 años	Femenino	Negativo
18	7 años	Masculino	Negativo
19	10 meses	Masculino	Negativo
20	1 año	Masculino	Negativo
21	1 año	Masculino	Negativo
22	1 año	Femenino	Negativo
23	30 años	Masculino	Negativo
X	13.5 años	M= 60.9% F = 39.1%	7 (30.4%)

TABLA No. 14

Porcentaje de *E. coli* y otros enteropatógenos recuperados de 23 muestras de un brote de diarrea del viajero

Bacteria (género y especie)	Diarrea del Viajero	
	No.	%
<i>E. coli</i>	14	46.7
<i>Morganella morgannii</i>	5	16.7
<i>Pseudomonas spp</i>	3	10.0
<i>V. cholerae</i>	1	3.3
<i>V. parahaemolyticus</i>	1	3.3
<i>V. vulnificus</i>	1	3.3
<i>Citrobacter freundii</i> H ₂ S (+)	1	3.3
<i>E. hermannii</i>	1	3.3
<i>E. fergusonii</i>	1	3.3
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	3.3
<i>Kluyera spp</i>	1	3.3
Total	30	100.0

TABLA No. 15

Relación de muestras diarreicas del brote de Campeche con más de un enteropatógeno aislado

No. de muestra	No. de folio	Bacterias aisladas
1	15519	<i>E. coli</i> y <i>P. aeuroginosa</i>
8	15526	<i>E. coli</i> y <i>Kluyera</i> sp.
11	15529	<i>V. cholerae</i> O1 y <i>Pseudomonas spp.</i>
14	15532	<i>E. coli</i> y <i>C. freundii</i> H ₂ S (+)
16	15534	<i>E. coli</i> y <i>E. hermannii</i>
21	15539	<i>E. fergusonii</i> , <i>Ps. maltophilia</i> y <i>V. parahaemolyticus</i>

En 6 de 23 muestras se aisló más de un enteropatógeno y 4 de ellas estuvieron asociadas a *E. coli*. El único aislamiento de *V. cholerae* O1 que se obtuvo en el brote provenía de una muestra en la cual también se aisló *Pseudomonas* spp (Cuadro 15).

En la Tabla No. 16 se presenta una distribución de las cepas *E. coli* recuperadas de alimentos y muestras fecales de humanos. Se trabajaron un total de 310 cepas de las cuales se recuperaron 104 (33.5%) cepas de *E. coli* de acuerdo a la siguiente relación : 25 (25%) correspondieron a CM, 9(18%) a H, 6(7.5%) de alimentos, 14 (46.4%) de muestras diarreas de un brote de Campeche y 50 cepas de *E. coli* recuperadas de heces de niños con y sin diarrea. Los ensayos posteriores se enfocaron solamente al estudio de las 104 cepas de *E. coli*.

Los resultados obtenidos del comportamiento bioquímico con ornitina y lisina se reportan en la Tabla No. 17 y se observa que: 51(49%) cepas fueron ORN positiva, 67 (64.4%) descarboxilaron la lisina y únicamente 21(20%) fueron incapaces de fermentar el sorbitol utilizando el método en placa y únicamente el 8.6% de las cepas fueron ORN (+), LIA (+) y SOR-P (-). Al comparar los resultados anteriores se observa que no existe una correlación significativa entre dichas características bioquímicas, ya que de acuerdo a los resultados se obtuvieron cepas sorbitol negativo incapaces de descarboxilar la ornitina y / o la lisina.

Diversos métodos se han desarrollado para el aislamiento e identificación de *E. coli* O:157H:7 en alimentos y muestras clínicas ; tal es el caso de la utilización de pruebas de fermentación de sorbitol. De acuerdo a lo reportado en la literatura y como parte de los objetivos de este trabajo se trató de caracterizar cepas EHEC que pudieran presentar la propiedad de no fermentar el sorbitol y ser productoras de citotoxinas.

En la Tabla No. 18 se muestran los resultados obtenidos de la recuperación de *E. coli* no fermentadoras de sorbitol. El porcentaje de cepas provenientes de CM que son incapaces de fermentar el sorbitol fué de 4 (16%), 6(24%), 6(24%) y 3 (12%) por las técnicas de SOR-T,

TABLA No. 16

Frecuencia de aislamiento de *E. coli* provenientes de alimentos y muestras clínicas humanas.

Tipo de muestra	Total de cepas aisladas No.	Total de cepas <i>E. coli</i> No. (%)
Carne molida cruda	100	25 (25%)
Hamburguesas	50	9 (18%)
Otros alimentos	80	6 (7.5%)
Diarrea del viajero	30	14 (46.4%)
Heces de niños con y sin diarrea	* 50	50 (100%)
Total 104(33.54%)	310	

* Se trabajaron cepas puras

TABLA No. 17

Frecuencia de aislamiento y comportamiento bioquímico de 104 cepas de *E. coli* aisladas de muestras diarreicas y alimentos.

Origen	CM No. %	H No. %	A No. %	DV No. %	CE No. %	Total No. %
Pruebas	25 (100%)	9 (100%)	6 (100%)	14 (100%)	50 (100%)	104 (100%)
bioquímicas						
Lisina	21(84%)	7(87.5%)	0 (0%)	1(7.1%)	38(90.4%)	67(64.4%)
Ornitina	15(60%)	8 (100%)	3(75%)	7(50%)	18(42.8%)	51(49.%)
SOR-P (-)	6(24%)	1(11.1%)	1(16.6%)	9(63.3%)	4(8%)	21(20%)
LIA (+) MIO	2(8%)	1(11.1%)	0(0.0%)	2(14.3%)	4(8%)	9(8.6%)

(+) SOR-P (-)

SOR-P, SOR-MP y API, respectivamente. En comparación con lo obtenido en cepas provenientes de H los porcentajes de aislamiento de *E. coli* no fermentadoras de sorbitol por los métodos de SOR-T, SOR-P, SOR-MP y API, fueron de 1 (11.1%), encontrándose similitud con lo obtenido para A en donde por los métodos ya mencionados se identificó 1 (16.5%) cepa con ésta característica.

El porcentaje de recuperación de cepas *E. coli* sorbitol negativo obtenidas de muestras clínicas de niños con y sin diarrea, de acuerdo al método empleado fueron los siguientes: 5 (10%) SOR-T, 4 (85%) SOR-P y 6 (12%) SOR-MP. La variación de los resultados obtenidos denota la diferencia de especificidad y sensibilidad que existe entre los métodos utilizados.

Analizando la Tabla No. 18 se observa que la mayoría de las cepas *E. coli* de las muestras provenientes del brote de diarrea de Campeche fueron sorbitol negativo y se obtuvieron los siguientes porcentajes: 10 (71.4%) para los métodos de SOR-T, SOR-MP y API y 9 (64.3%) por el método de SOR-P.

En la Tabla No. 19 se realizó un análisis estadístico de los cuadros de 2 x 2 y se determinó la especificidad y sensibilidad del método de sorbitol en placa en comparación con los ensayos en tubo y microplaca. La especificidad y sensibilidad del método en placa utilizando agar MacConkey-sorbitol en comparación con el ensayo en tubo fue del 90% y del 96.4% respectivamente. Este método se comparó también con el ensayo en microplaca y se observó una especificidad del 87.5% y una sensibilidad del 100%

Para la tipificación serológica de las 104 cepas de *E. coli* se utilizaron los siguientes antiseros: O:6, O:8, O:15, O:20, O:26, O:55, O:63, O:78, O:111, O:126, O:148 y O:157, con la finalidad de observar si existía una relación del origen de las cepas con algún serotipo en especial; de acuerdo a lo anterior en la Tabla No. 20 se muestra los resultados porcentuales de las cepas *E. coli* tipificables y no tipificables; en esta tabla se puede observar que 29 (27.8%) de las

TABLA No. 18

Recuperación de cepas *E. coli* no fermentadoras de sorbitol aisladas muestras de alimentos, de niños con y sin diarrea y de un brote de diarrea del viajero.

Cepas <i>E. coli</i>	% de incapacidad para fermentar el sorbitol			
	Método			
104 (total)	SOR-T	SOR-P	SOR-MP	API
25 (CM)	4 (16%)	6 (24%)	6 (24 %)	3 (12%)
9 (H)	1 (11.1%)	1 (11.1%)	1 (11.1%)	0 (0%)
6 (A)	0 (0%)	1 (16.6%)	1 (16.6%)	1 (16.6%)
50 (CE)	5 (10%)	4 (8%)	6 (12 %)	*
14 (DV)	10 (71.4%)	9 (64.3%)	10 (71.4%)	10 (71.4%)

* No se realizó la prueba.

TABLA No. 19

**Determinación de la Especificidad y Sensibilidad del Método de SOR-P
en comparación con SOR-T y SOR-MP**

SOR-T o SOR-MP

SOR-P	A ++	B +-
	C -+	D --

FORMULAS

$$\text{Especificidad} = \frac{D}{B + D} \times 100$$

$$\text{Sensibilidad} = \frac{A}{A + C} \times 100$$

METODO: Sorbitol en placa (agar MacConkey-sorbitol)

	SOR-T	SOR-MP
Especificidad	$\frac{18}{2 + 18} = 90\%$	$\frac{21}{3 + 21} = 87.5\%$
Sensibilidad	$\frac{81}{81 + 3} = 96.4\%$	$\frac{80}{80 + 0} = 100\%$

cepas aglutinaron con los antisueros somáticos utilizados, 22(44%) de las cuales correspondieron a aislamientos de infantes con y sin diarrea y 6 (12%) quedaron incluidas en el grupo EHEC, sin que alguna correspondiera al serotipo O:157. De las cepas obtenidas del brote de diarrea del viajero ninguna aglutinó con los antisueros utilizados y unicamente 3 (21.4%) fueron rugosas.

De las cepas *E. coli* aisladas de alimentos solamente 7 se tipificaron con los antisueros utilizados en este estudio de las cuales 5 (20%) provenían de CM, 1 (11.1%) de H y 1 (16.4%) de A; ninguna de las cepas aglutinó con el antisuero O:157 o con algún serotipo de los que se incluyen en el grupo EHEC.

Cabe mencionar que 75 (72.1%) cepas no aglutinaron con los 13 antisueros somáticos utilizados y 8 (7.6%) cepas fueron rugosas.

En la Tabla No. 21 se muestran los resultados obtenidos de las expresiones fenotípicas: serología, capacidad de fermentar el sorbitol y efecto citotónico (CTT) y/o citotóxico (CTX) en cultivo celular, las cepas que se analizan en esta tabla provienen de alimentos; las características anteriores se enlistaron con la finalidad de correlacionarlas con expresiones genotípicas asociadas a la toxina LT. De acuerdo a lo reportado en esta tabla se observa que de las 7 cepas de *E. coli* serotificadas 5 se aislaron de CM, 1 de H y 1 de Pescado. Al analizar los datos obtenidos de las muestras de CM se observó que la cantidad de coliformes presentes en estas muestras era superior a 1,100 UFC / g. Unicamente la cepa CM-6a fué sorbitol negativo y no estuvo asociada al serotipo O:157, ya que aglutinó con el O:148; llama la atención que este serotipo se vió involucrado también en las cepas CM-4c y CM-4f. Por otra parte las cepas CM-6d y CM-8b aglutinaron con los antisueros O:8 y O:126 respectivamente. En cuanto a los resultados del ensayo en cultivo celular, la característica común de actividad biológica entre estas cepas fué la presencia de efecto citotónico. Este efecto se caracteriza por el alargamiento reversible de las células Vero (Figura No. 5 y 7). Solamente una cepa

TABLA No. 20

Tipificación serológica de 104 cepas de *E. coli* aisladas carne molida cruda, hamburguesas, heces de un brote de diarrea del viajero y de niños con y sin diarrea.

Muestras	% de cepas					
	Total	tipificables	grupo EHEC	O:157H7	no tipificables	* Rugosas
CM	25 (100%)	5 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	20(80%)	3 (12%)
H	9 (100%)	1(11.11%)	0 (0%)	0 (0%)	8(88.9%)	0 (0%)
A	6(100%)	1 (16.4%)	0 (0%)	0 (0%)	5(83.3%)	0 (0%)
DV	14(100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	14(100%)	3(21.4%)
CE	50 (100%)	22(44%)	6 (12%)	0 (0%)	28(56.0%)	2(4.0%)
Total	104(100%)	29(27.8%)	6 (5.7%)	0 (0%)	75(72.11%)	8(7.69%)

TABLA No. 21

Características fenotípicas y genotípicas de 7 cepas *E. coli* serotipificadas y obtenidas de alimentos

Cepa	UFC de coliformes	SOR-P	Serología	Efecto en CC	Prueba de la mancha
CM-4c	+1,100	+	O:148	*	+
CM-4f	+1,100	+	O:148	CTT + CTX	+
CM-6a	+1,100	-	O: 148	CTT	+
CM-6d	+1,100	+	O: 8	CTT	+
CM-8b	+1,100	+	O:126	CTT	+
H-1e	9.2	+	O: 8	CTT	+
A-4	*	+	O:15	CTT + CTX	+

presentó efecto CTT asociado a efecto CTX. Con respecto a las cepas obtenidas de H y A se observó que fueron sorbitol positivo por el método en placa (MacConkey-sorbitol) y aglutinaron con los antiseros O:8 y O:15 respectivamente; en cuanto al efecto observado en cultivo celular la cepa *E. coli* obtenida de H presentó efecto CTT y la cepa A-4 efecto CTT y CTX.

Por la Prueba de la mancha o " colony blot " 7 cepas hibridaron con la sonda LT, esto indica la presencia de genes que codifican para esta toxina. Al correlacionar estos datos con las características fenotípicas expresadas por algunas cepas se puede observar que la mayoría de ellas las podemos clasificar dentro del grupo ETEC.

En la Tabla No. 22 se enlistan algunas características fenotípicas como: serología, capacidad de fermentar el sorbitol y efecto citotónico y/o citotóxico en CC, en esta tabla se observa que 9 cepas de *E. coli* provenientes de casos de diarrea en infantes y 13 de heces normales; aglutinaron con los antiseros utilizados ; en cuanto a los resultados de sorbitol se observó que: la mayoría de las cepas fermentó este carbohidrato y solamente 3 fueron incapaces de hacerlo, cabe señalar que estas cepas estuvieron relacionadas con procesos diarreicos y correspondieron a los serotipos O:55, O:125 y O:111.

En esta tabla se observan también que los serotipos O:148, O:15, O:8, O:78, O:6, O:26, O:20, O:111 y O:63 estuvieron asociados a cepas aisladas de niños con diarrea. En cuanto a los resultados del ensayo en cultivo celular se observaron 17 cepas con efecto citotónico, 1 con efecto citotóxico y 4 presentaron ambos efectos. La evidencia genética de todas las cepas hacia la sonda LT fué positiva

Al realizar un análisis global de estos datos podemos decir que de acuerdo a las características fenotípicas y genotípicas observadas en estas cepas las podemos clasificar dentro del grupo ETEC. De estos datos llama la atención el hecho de que en las cepas CE-6, CE-24, CE-281 y

TABLA No. 22

Características fenotípicas y genotípicas
de 22 cepas serotipificadas de *E. coli* obtenidas de heces humanas

Cepa	Diarrea	SOR-P	Serología	Efecto en CC	Prueba de la mancha
CE-6	D	+	O:111	CTT	+
CE-24	D	+	O:111	CTT	+
CE-51	D	-	O:55	CTX	+
CE-65	D	+	O:15	CTT	+
CE-70	D	-	O:125	CTT	+
CE-78	D	-	O:111	CTT	+
CE-281	D	+	O:111	CTT	+
CE-702	D	+	O:148	CTT	+
CE-726	-	+	O:148	CTT	+
CE-812	-	+	O:15	CTT + CTX	+
CE-1003	-	+	O:8	CTT	+
CE-1023	-	+	O:78	CTT + CTX	+
CE-1025	-	+	O:6	CTT + CTX	+
CE-1089	-	+	O:15	CTT	+
CE-1167	-	+	O:26	CTT	+
CE-1179	-	+	O:15	CTT	+
CE-1197	-	+	O:15	CTT	+
CE-1202	-	+	O:20	CTT	+
CE-1241	-	+	O:111	CTT + CTX	+

CE-1165 serológicamente se pueden clasificar en el grupo EPEC aunque presentaran evidencias genéticas para incluirlas en el grupo ETEC y la mayoría de estas cepas provenían de heces no diarreas.

En la Tabla No. 22 también se observa que 13 cepas provenientes de niños sanos presentaron efecto CTT en CC en correlación a la hibridación con la sonda LT ; la única cepa que presentó efecto CTX el cual se caracteriza por el arredondamiento de las células y posterior lisis (Figura No. 4 y 6) fue aislada de una muestra diarreaica y presentaba la característica de no fermentar el sorbitol , esta cepa aglutinó con el antisuero O: 55 y tuvo evidencia genética por la prueba de la mancha para la codificación de la toxina LT.

Para detectar la actividad biológica enterotoxica y / o citotoxigénica en cultivo celular de las 104 cepas de *E. coli* se utilizó la técnica descrita por Chart y Scotland bajo ciertas modificaciones, y se observó que 3 (2.8%) cepas presentaron efecto citotóxico el cual inició en la mayoría de las cepas a las 24 h de incubación con la citotóxina El efecto fué progresivo y alcanzó a destruir más del 50% de la monocapa de células en un lapso de 96 h. En la Figura No. 4 y 6 se observa el efecto característico que provocan las citotóxicas en cultivo celular Vero (Tabla No. 23).

En la Tabla No. 23 también se reporta el porcentaje de cepas productoras de toxina LT y se observa que 74 (71.1%) presentaron esta característica la cual se manifiesta por el alargamiento y adelgazamiento reversible de las células (Figura No. 3 y 5), este efecto se inició en la mayoría de las cepas a las 6 h de incubación y se observó una recuperación total de las células aproximadamente en 24 h. Cabe señalar que el 16.3% de las cepas presentaron ambos efectos y únicamente 4 (3.8%) no presentaron efecto en cultivo celular. Como se observa en la Tabla No. 23 no se encontraron cepas *E. coli* productoras de VT en H y A y el número de cepas VT en CM, DV y CE fué el mismo. El porcentaje de cepas *E. coli* con evidencia genética para la codificación de la toxina LT fué del 91.3%. y se obtuvieron los siguientes porcentajes de

TABLA No. 23

**Actividad biológica en cultivo celular VERO de 104 cepas de *E. coli*.
y evidencia genética para LT por la prueba de la mancha**

Origen	No. de cepas	Producción de				Prueba de la mancha
		VT	LT	VT-LT	SE	
CM	25	1(4%)	16(64%)	1(4%)	2(8%)	20(80%)
H	9	-	4(44.4%)	3(33.3%)	1(11.1%)	7(77.7%)
A	6	-	5(83.3%)	1(16.7%)	-	6(100%)
DV	14	1(7.1%)	7(50%)	5(35.7%)	1(7.1%)	14(100%)
CE	50	1(2%)	42(82%)	7(14%)	-	48(96%)
Total	104(100%)	3(2.8%)	74 (71.1%)	17(16.3%)	4(3.8%)	95(91.3%)

TABLA No. 24

**Porcentaje de cepas no tipificables con efecto
en cultivo celular y prueba de la mancha (+) o (-)**

Muestra	Cepas no tipificables	Efecto en cultivo celular	Prueba de la mancha
Alimentos 40 (38.4%) cepas <i>E. coli</i>	20 (50%)	Citotónico	+
	0 (0%)	Citotóxico	+
	4 (10%)	Citotónico + citotóxico	+
	4 (10%)	Citotónico	-
	1 (2.5%)	Citotóxico	-
	1 (2.5%)	Citotónico + citotóxico	-

Total	30 (28.8%)
--------------	-------------------

Muestra	Cepas no tipificables	Efecto en cultivo celular	Prueba de la mancha
Heces 64(61.5%) cepas <i>E. coli</i>	32 (50%)	Citotónico	+
	1 (1.6%)	Citotóxico	+
	8 (12.5%)	Citotónico + citotóxico	+
	1 (1.6%)	Citotónico	-
	0 (0%)	Citotóxico	-
	0 (0%)	Citotónico + citotóxico	-

Total	42 (40.3%)
--------------	-------------------

acuerdo al origen de la muestra: 20(80%)-CM, 7(77.7%)-H, 6(100%)-A, 14(100%)-DV y 48(96%)-CE. Cabe resaltar que las 3 cepas que presentaron efecto citotóxico en cultivo celular tuvieron evidencia genética para la producción de LT. En la Figura No. 8 se observan una membrana que muestra los resultados obtenidos en la prueba de la mancha, revelada por la técnica de NBT en donde las manchas son la evidencia de la hibridación con la sonda LT.

Como ya se mencionó anteriormente la mayoría de las cepas *E. coli* trabajadas fueron no tipificables con los antisueros empleados. De estas cepas 30 (28.8%) fueron aisladas de alimentos y 42 (40.3%) de muestras humanas. En la Tabla No. 24 se establece una relación de estas cepas con respecto a los resultados obtenidos en los ensayos de CC y Prueba de la Mancha; de acuerdo a estos resultados podemos observar que en las cepas *E. coli* aisladas de alimentos 20 (50%) presentaron efecto CTT con Prueba de la mancha positiva, 4 (10%) efecto CTX y CTT con evidencia genética para LT positiva y los porcentos de cepas no tipificables con prueba de la mancha negativa y efecto en CC fueron los siguientes: 4 (10%) efecto CTT, 1 (2.5%) efecto CTX y 1 (2.5%) efecto CTX y CTT.

En las cepas *E. coli* no tipificables obtenidas de muestras clínicas humanas se observó que cuando se presentaba un ensayo positivo para la prueba de la mancha los porcentos de cepas con efecto CTT, CTX o ambos, fueron los siguientes: 32 (50%), 1 (1.6%) 8 (12.5%) respectivamente. Por el contrario cuando la prueba de la mancha fué negativa solamente se recuperó 1 (1.6%) con efecto CTT en CC.

En la Tabla No. 25 se presenta una recopilación de los datos que nos pueden ayudar a evaluar el efecto en CC en correlación con la incapacidad de fermentar el sorbitol. Con respecto a los resultados obtenidos de las cepas *E. coli* aisladas de CM se observa que 6 (24%) de las 25 cepas trabajadas fueron incapaces de fermentar el sorbitol; de estas cepas 1 (4%) presentó efecto CTX, 4 (16%) efecto CTT y 1 (4%) ambos efectos. De las cepas anteriores

únicamente 1(4%) fué tipificable y correspondió al serotipo O:148. Con respecto al comportamiento de las cepas *E. coli* recuperadas de H y A se observó que solamente 1 (11.1%) cepa fué sorbitol negativo, en el caso de la cepa aislada de H presentó efecto CTX y CTT. En la cepa sorbitol negativo aislada de A se observó efecto CTT asociado a la no fermentación de sorbitol 1 (16.6%). En ambos casos las cepas fueron no tipificables con los antiseros somáticos empleados. El mayor porcentaje de recuperación de cepas *E. coli* no fermentadoras de sorbitol, se observó en las muestras del brote de diarrea del viajero (64.3%). Al correlacionar esta característica con los resultados obtenidos en el ensayo en CC se observó 1(7.1%) cepa que presentó efecto CTX, 3(21.4%) efecto CTT y 4(28.5%) ambos efectos, únicamente una cepa (7.1%) fue sorbitol negativo y no presentó efecto en CC.

La recuperación de cepas *E. coli* sorbitol negativo provenientes de muestras clínicas de niños con y sin diarrea fue del 8% y su efecto en CC quedó distribuido de la siguiente manera: 1 (2%) cepa presentó efecto CTX, y 3(6%) efecto CTT; el 6% de estas cepas fue tipificable y aglutinaron con los antiseros O:55 y O:111 respectivamente. El análisis global de este cuadro indica que el porcentaje de recuperación de cepas *E. coli* no fermentadoras de sorbitol asociadas a efecto CTX fue muy bajo y al comparar los resultados de acuerdo al origen de las cepas *E. coli* se observó similitud en ellos, ya que en CM, DV y CE solamente se aisló una cepa con estas características.

Por último ninguna de estas cepas aglutinó con el antisuero O:157, caso contrario a lo esperado. Del total de cepas trabajadas ninguna fue sorbitol positivo asociada a efecto CTX en CC utilizando la línea Vero. Hay que señalar que el 9.6% de las cepas fueron sorbitol positivo y presentaron efecto CTX y CTT, estas cepas provenían de las siguientes muestras: 2(2.2%)-H, 1(16.6%)-A, 1(7.1%)-DV y 7(14%)-CE.

TABLA No. 25

Recuperación de *E. coli* de sorbitol positivo asociada a efecto citotóxico (CTX) o citotónico (CTT) en cultivo celular Vero.

104 cepas Características	CM	H	A	DV	CE
	25 (100%)	9 (100%)	6 (100%)	14 (100%)	50 (100%)
sorbitol positivo	19 (76%)	8 (88.8%)	5 (83.3%)	5(35.7%)	46 (92%)
sorbitol positivo con efecto CTX	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
sorbitol positivo con efecto CTT	13 (52%)	4 (44.4%)	4 (66.6%)	4 (28.6%)	39 (78%)
sorbitol positivo con efecto CTX y CTT	0 (0%)	2 (22.2%)	1 (16.6%)	1 (7.1%)	7 (14%)
sorbitol positivo sin efecto	2 (8%)	1 (11.1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
cepas sorbitol positivo tipificadas	4 (16%)	1 (11.1%)	1 (16.6%)	0 (0%)	19 (38%)

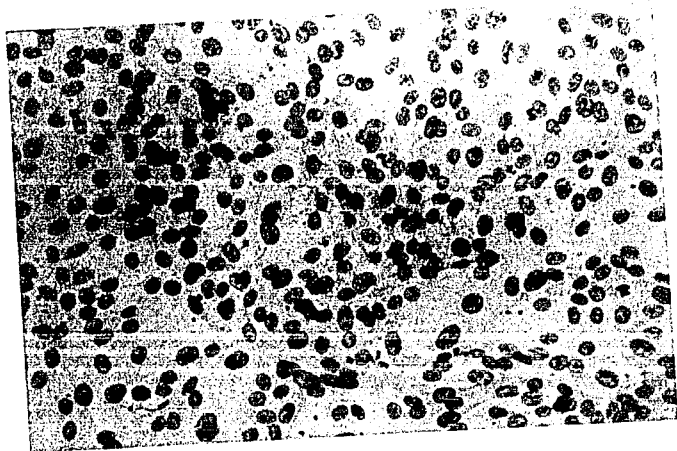


FIGURA No. 3 Control de las células VERO sin inocular (100 X) . Monocapa normal de células Vero con una confluencia del 90%

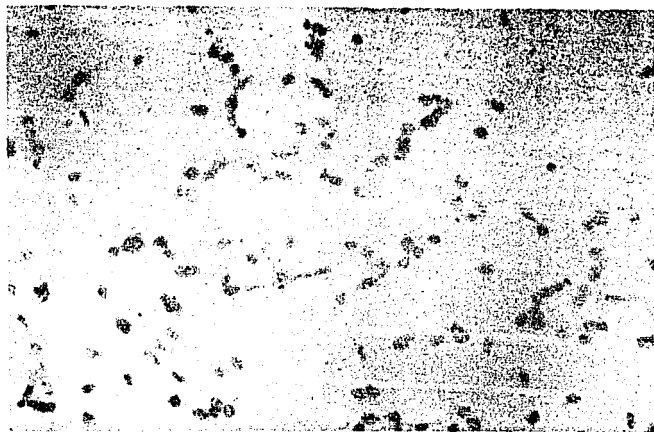


FIGURA No. 4. Control positivo de efecto citotóxico en células VERO (100X) . Cepa *E. coli* H: 30. Este efecto se caracteriza por el redondamiento y lisis celular

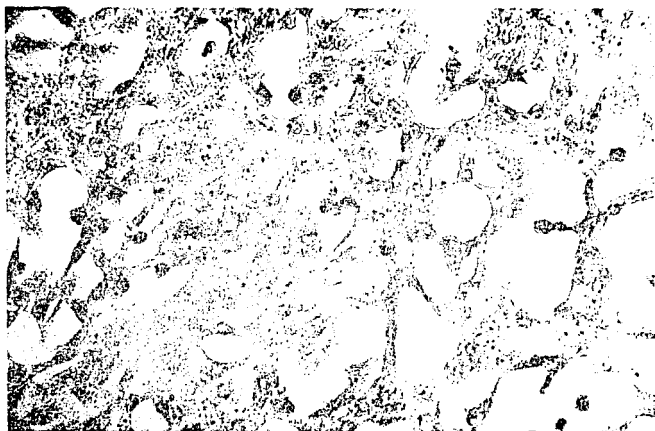


FIGURA No. 5. Control positivo de efecto citotónico en células VERO (100 X). Cepa *E. coli* H:10407. Este efecto se caracteriza por un alargamiento reversible de las células

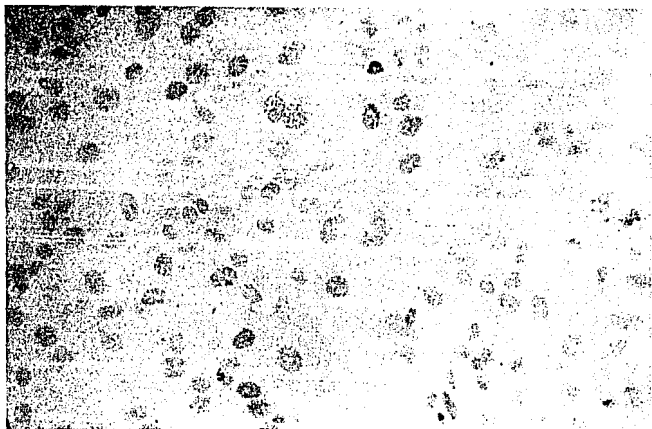


FIGURA No. 6 Efecto citotóxico en células VERO de la cepa *E. coli* CE-51 (100 X)

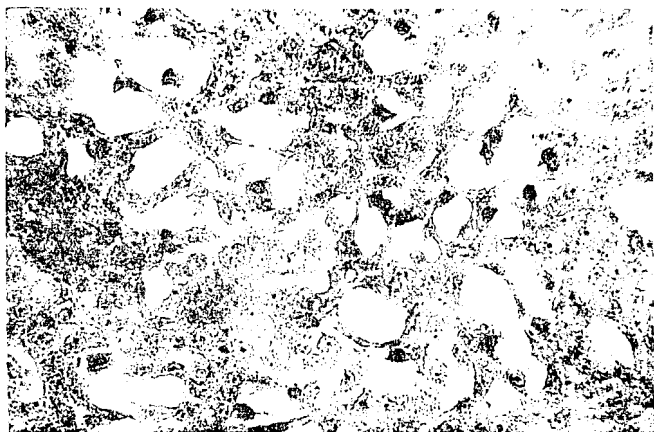


FIGURA No. 7. Efecto citotónico en células VERO de la cepa *E. coli* CE-811 (100 X)

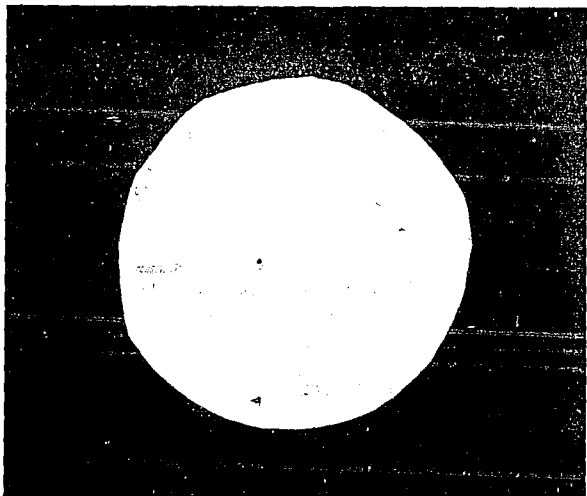


FIGURA No. 8 Membrana revelada por la técnica de NBT. La presencia de las manchas indica la complementariedad entre la sonda LT no radiactiva y el material genético de las cepas *E. coli* estudiadas.

XIII. DISCUSION

Estudios epidemiológicos realizados en México reportan que suceden aproximadamente 20 brotes de infecciones gastrointestinales por año asociadas al consumo de alimentos contaminados principalmente por enterobacterias; sin embargo hasta la fecha no se tiene reportes de investigaciones enfocadas al estudio de *E. coli* productora de citotóxicas como agente contaminante de CM y H (25).

La cantidad de coliformes y otros enteropatógenos de interés clínico que se aislaron de los alimentos monitoreados indican una alta contaminación de tipo fecal. Aunque la finalidad de este estudio no fué conocer el origen de la contaminación, se puede indagar que esta se debe a varios factores en los que Arnold y cols (2) y Padhyf y cols (54) incluyen la contaminación del músculo por el contenido intestinal del animal y su posterior distribución durante el proceso de molienda, no olvidando que el manipulador también juega un papel importante como fuente de contaminación.

En este trabajo se investigó también si *E. coli* fué la responsable de un brote de diarreico ocurrido en Campeche. En la Tabla No. 15 se reporta que *E. coli* fue la enterobacteria con mayor frecuencia aislada, seguida de *Morganella morganii* y *Pseudomonas* spp. Cabe mencionar el aislamiento de una cepa de *V. cholerae* O 1. Por datos estadísticos reportados en el boletín informativo: Carta a la Salud, se sabe que *E. coli* es la enterobacteria con mayor frecuencia aislada de casos de diarrea del viajero y que los aislamientos de cepas diferentes a ETEC denotan su naturaleza multifactorial, estos antecedentes concuerdan con lo obtenido en este estudio (Tabla No. 15).

Los aislamientos de enterobacterias principalmente *V. cholerae* O: 1 en muestras clínicas de brotes de diarrea del viajero sugiere tener mayor vigilancia y un seguimiento

epidemiológico para evitar la diseminación de brotes a través del consumo de alimentos contaminados.

En México existe una frecuencia del 80 % de casos de diarrea del viajero asociado a ETEC que la afecta a infantes y adultos sin distinción de sexo (7). En este estudio se encontró que el promedio por edad fue de 13.5 años, afectando principalmente a hombres en un 60.8%.

E. coli O:157H:7 es el agente etiológico que se ha asociado frecuentemente a hamburguesas contaminadas; algunos investigadores como Szabo y cols. reportan que el único serotipo de *E. coli* incapaz de fermentar el sorbitol es el O:157H:7 (54). Haldane y cols en 1986 por su parte proponen utilizar pruebas bioquímicas suplementarias como ornitina y lisina en conjunción con el sorbitol para mejorar la especificidad de la prueba por eliminación de cepas ornitina y lisina negativas, ellos indican que estas características fenotípicas ayudan a identificar cepas *E. coli* O:157H:7 sin el uso del antisuero somático y flagelar correspondiente (29). De acuerdo a lo reportado en la literatura y como parte de los objetivos de este trabajo se trato de caracterizar cepas EHEC que pudieran presentar la propiedad de no fermentar el sorbitol y ser productoras de citotoxinas.

Al realizar un análisis de los resultados de recuperación de cepas *E. coli* incapaces de fermentar el sorbitol en correlación al serotipo asociado, se observaron datos diferentes a los reportados por Szabo y cols (54), debido a que ninguna de las cepas sorbitol negativo correspondió al serotipo O:157; por el contrario se encontró asociación con los serotipos O:55, O:111, O:125 y O:148; esta última cepa provenía de una muestra de CM y las 3 primeras de muestras clínicas. La evidencia de una cepa sorbitol negativo diferente a 1 serotipo O:157H:7 fue reportada en 1990 por Borczyk y cols. y correspondió al serotipo O:148 NM sorbitol negativo (54), este dato se correlaciona con lo observado en el ensayo de recuperación de cepas *E. coli* sorbitol negativo. El resto de las cepas no fue tipificable con los 13 antisueros somáticos utilizados.

De acuerdo a lo anterior y a lo reportado por Padhyf y cols. en 1992, algunas cepas diferentes al serotipo O:157H:7 pueden ser sorbitol negativo. Por lo tanto este tipo de pruebas deben confirmarse por ensayos de serotipificación para evitar aislamientos falsos positivos ; o bien mediante la utilización de la metodología propuesta por Famis y Davis en 1985 (54).

El método de agar MacConkey - sorbitol con respecto a los resultados obtenidos en tubo y microplaca sugieren que es un método práctico, sencillo, específico y sensible para ser utilizado como metodología de rutina en un laboratorio que cuente con el mínimo de equipo. La placa de agar MacConkey-sorbito fue empleada por March y cols en 1986 y Ritchie y cols en 1992 obtuvieron resultados favorables en el aislamiento de O:157H:7 (44, 63). Haldane y cols en 1986 propusieron que la descarboxilación de la ornitina y la lisina se relacionan a la no fermentación de sorbitol. En comparación con los resultados obtenidos en este trabajo, la descarboxilación de ornitina y lisina no es útil para la selección de cepas sorbitol negativo, ya que únicamente el 42.8% de las cepas sorbitol negativo estuvieron asociadas a la descarboxilación de ornitina y lisina; como se observa el porcentaje de correlación entre dichas expresiones fenotípicas no es representativo, debido a que pueden presentarse cepas sorbitol negativo con expresiones metabólicas de ornitina y lisina diferentes

En la serotipificación únicamente 29 (27.8%) cepas aglutinaron con los antiseros somáticos empleados, 22 (21.1%) correspondieron a cepas *E. coli* aisladas de alimentos y 7 (6.7%) de muestras clínicas. Ninguna de las cepas aglutinó con el antisero O:157, caso contrario a lo reportado por Wells y cols en 1991 (79); ellos encontraron una frecuencia de aislamiento a partir de carne de origen bovino del 2%. El CDC ha detectado únicamente cepas *E. coli* O:157H7 en menos de 3000 aislamientos serotipificados en el periodo de 1973-1982, por otra parte el centro de referencia de la Universidad de la Gran Bretaña no ha reportado el serotipo O:157H:7 en menos de 20,000 cultivos (80) y nuestros resultados

muestran que el serotipo O:157H:7 no se aisló. Whittam y cols. (78) sugieren que cuando no se aísla este serotipo en alimentos de origen bovino puede deberse a que la cantidad de UFC / g de muestra es menor de 10^3 o que la carne no estaba contaminada con este agente. En el caso de que las muestras de alimentos trabajadas hubieran estado contaminadas con el serotipo O:157H7 posiblemente este no se aisló debido a que la cantidad de UFC de *E. coli* O:157H:7 por gramo de muestra era menor de 10^3 (Tabla No. 10) y además los aislamiento estuvieron asociados a la presencia de otros coliformes que fueron cuantificados por el método de NMP. (Gráfica 1 y 2).

El no aislamiento del serotipo O:157H:7 a partir de muestras de heces de niños con y sin diarrea confirman lo reportado por Herrera en 1987 (30) y Parra en 1990 quienes estudiaron muestras diarreicas sanguinolentas y reportan que el serotipo O:157H:7 no está involucrado en México. Sin embargo Benitez y cols en 1991 al muestrear infantes de 0-24 meses reportaron 17% de cepas pertenecientes al grupo EHEC y no mencionan si el serotipo O:157H:7 estuvo involucrado. Lo anterior hace suponer según lo descrito por Whittam y cols. en 1988 (80) y Doyle (2) que el serotipo O:157H:7 descende de una clona distribuida en Norteamérica y en otros países desarrollados.

75 (72.1%) cepas *E. coli* no aglutinaron con los antisueros somáticos utilizados, esto plantea la necesidad de conocer que grupos están involucrados en nuestro país, por lo que se requiere emplear una batería de antisueros somáticos y flagelares más amplia según lo descrito en el esquema de tipificación de Kauffman y Dupont (15, 53)

En algunos brotes diarreicos ocurridos en infantes de Estados Unidos los serotipos predominantes fueron O:55 y O:111. En este caso el serotipo con mayor frecuencia aislado fue el O:15 que serologicamente corresponde al grupo EPEC, en segundo término O:111, y en orden decreciente O:26, O:125 y O:126. El resto de los serotipos encontrados quedaron

incluidos en el grupo ETEC y fueron O:148, O:8, O:63, O:78, O:6 y O:20. Herrera (30) reporta que el serotipo O:111 es frecuentemente aislado de casos de niños con y sin diarrea

E. coli puede causar diarrea mediante la producción y liberación de toxinas en la luz del intestino y son responsables del daño parcial o total del huésped. Las enterotoxinas que provocan la muerte del enterocito son referidas como citotoxinas y las que solo producen alteraciones intracelulares, pero sin llegar a producir la muerte se denominan toxinas citotónicas. La producción de la toxina se realizó en CST y de acuerdo a los resultados de estandarización se utilizó una concentración de células por pozo de 1.8×10^4 , con la finalidad de obtener una confluencia del 90 -100% a las 24 h. Konowalchuck y cols. (38) por su parte sugieren utilizar una concentración 5×10^4 de células Vero por cada pozo.

En la Tabla No. 23 se muestra el porcentaje de recuperación de cepas *E. coli* productoras de citotóxicas y enterotoxinas de las 104 cepas trabajadas el 2.8% correspondió a cepas productoras de VT, 2 de estas cepas provenían de muestras clínicas y una de carne molida. Cabe mencionar que para fines prácticos en este estudio se utilizara VT como sinónimo de citotóxicas, ya que algunos autores solo denominan toxinas VT cuando se han realizado ensayos de neutralización o de biología molecular (66, 67).

El porcentaje de recuperación de cepas productoras de citotóxicas aisladas de niños con y sin diarrea resultó ser más bajo que el reportado por Herrera en 1987 (30) quien trabajó también con infantes con y sin diarrea.

Zepeda y cols en 1985 (84) mencionan que el aislamiento de VT en niños recién nacidos es del 3%, resultado muy similar al reportado en la Tabla No. 23. Se aisló la misma cantidad de cepas VT en las muestras de CM, DV y CE aunque la proporción no fue la misma debido al tamaño de muestra. El efecto más frecuentemente observado fue el citotónico y la mayoría de las muestras se presentó una proporción por arriba del 50% excepto para H.

El 82% de las cepas provenientes de infantes con y sin diarrea elaboraron toxina LT , lo anterior concuerda con lo descrito por Cravioto y cols . en 1988 (11) , ellos encontraron que las cepas ETEC son el germen intestinal que se aísla con mayor frecuencia de niños durante los primeros años de vida.

Ninguna de las cepas *E. coli* serotipificadas y aisladas de alimentos estuvo asociada a efecto CTX en CC. Los estudios realizados por Márquez y cols. en 1986 (45) reportan aislamientos positivos para *E. coli* O:157H:7 con producción de citotóxicas y Padhyf y cols. reportan un 36.4% de cepas productoras de citotóxicas aisladas de carne de bovino, sin que estas estuvieran asociadas al serotipo O:157H:7. En este estudio se presentó únicamente una cepa productora de citotoxinas la cual fue no tipificable con los antiseros somáticos empleados.

Del total de cepas el 16.3% presentó ambos efectos en cultivo celular y en el 3.8% no se observó ningún efecto, lo cual indica que estas cepas probablemente tienen otro mecanismo de patogenicidad o el método no detectó la producción de citotóxicas debido al número elevado de pases el cual disminuye la sensibilidad de las células (30). Márquez y cols (45) sugiere que las cepas productoras de bajos niveles de toxinas no se detectan en CC.

La mayoría de las cepas presentó efecto CTT en CC observándose que 74 /104 provocaron alargamiento en las células VERO y 95/104 presentaron evidencia genética para la producción de LT. De acuerdo a estos resultados existe una variación de 21 cepas en las cuales la expresión genotípica no correlacionó con la expresión fenotípica; lo anterior se puede atribuir a que por algún mecanismo el gene que codifica para la producción de la toxina este reprimido y por lo tanto no se expresó la toxina. Sin embargo podemos afirmar que la mayoría de las cepas genética y fenotípicamente quedaron incluidas en el grupo ETEC. La evidencia de que la mayoría de las cepas aisladas de alimentos fueron ETEC concuerda con lo descrito en la carta a la salud pública y por lo reportado por Doyle (2 , 7).

En las cepas CM-4f y A-4 se observó efecto CTT y CTX asociados a serotipos ETEC; esto indica que un microorganismo puede estar asociado más de un mecanismo de patogenicidad. De las muestras clínicas se serotificadas 22 cepas provenientes de niños con y sin diarrea. Las 22 cepas tuvieron evidencia genética para la producción de LT y 17/22 presentaron efecto citotónico en CC, de estas 11/17 correspondieron serológicamente al grupo ETEC y 6/17 al grupo EPEC, siendo el serotipo O:111 el más común; estos resultados concuerdan con lo reportado por Herrera (30), quien encontró cepas *E. coli* O:111 asociadas a efecto CTT en cultivo celular. Únicamente en la cepa CE-51 se observó efecto CTX con Prueba de la mancha positiva. Los resultados anteriores sugieren que cepas *E. coli* serotipos clásicas EPEC también pueden producir citotoxinas, los datos anteriores se correlacionan con lo observado por Benitez y cols. (4) reportan un 11% de cepas productoras de citotoxinas y un 7% pertenecientes al grupo ETEC.

Cabe mencionar que 9/22 cepas estuvieron asociadas a procesos diarreicos, de acuerdo a lo descrito por O'Brien (51, 52), la cantidad de toxinas está directamente relacionada con la enfermedad y en este aspecto también se involucran varios factores como: resistencia o inmunidad natural o adquirida del huésped o bien ha cambios en la virulencia del germen; de aquí que los portadores participan en forma importante en la propagación de infecciones.

Llama la atención que de las cepas no tipificables 5/104 presentaron efecto CTT en CC con prueba de la mancha (-), lo anterior sugiere la presencia de una variante de la toxina LT, por lo que es recomendable seguir realizando ensayos genéticos para caracterizarlas.

Se puede establecer que las cepas que se salen de un patrón de comportamiento bioquímico y serológico mediante el cual podemos caracterizarlas en correlación a su actividad o pérdida de factores de virulencia transmitidos por plásmidos o fagos, de aquí la importancia de realizar ensayos de biología molecular que contribuyan al estudio epidemiológico de cepas *E. coli* productoras de citotoxinas y su frecuencia en brotes diarreicos asociados al consumo de alimentos en la población Mexicana.

XIV. CONCLUSIONES

- * Se aislaron y caracterizaron 104 cepas de *E. coli*, obteniéndose 3 (2.8%) productoras de citotoxinas que serológicamente no correspondieron al grupo EHEC.
- * De acuerdo a expresiones fenotípicas y genotípicas 93 (89.4%) cepas de *E. coli* correspondieron a el grupo ETEC.
- * Recomendamos al sector salud tener una vigilancia estricta en el control sanitario de alimentos especialmente carne de origen bovino, para evitar brotes diarreicos esporádicos asociados al consumo de alimentos contaminados.
- * La descarboxilación de la ornitina y lisina como pruebas bioquímicas suplementarias no mejoran la especificidad en el aislamiento de cepas sorbitol negativo por exclusión de *E. coli* ornitina y lisina negativas.
- * El método de agar MacConkey - sorbitol, es un método sencillo, rápido, específico y sensible en la detección de cepas sorbitol negativo.
- * La incapacidad de fermentar el sorbitol no es una característica exclusiva del serotipo O:157H:7.

- * No hubo correlación entre la producción de citotóxicas y la incapacidad de fermentar el sorbitol. Por lo tanto este ensayo no es indicativo de la producción de citotoxinas.

- * Se sugiere realizar ensayos que determinen la presencia de la enzima β glucuronidasa correlación a la actividad citotóxica en cultivo celular VERO y CaCo y presencia del efecto "attaching and effacing" en modelos animales.

XV. APENDICE

A. SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

A.1 Soluciones

A.1.1 Solución amortiguadora de fosfatos : PBS (43)

Solución A 10X

NaCl.....	80.0 g
KCl.....	2.0 g
Na ₂ HPO ₄	11.5 g
KH ₂ PO ₄	2.0 g
H ₂ O destilada.....	800.0 ml

Solución B 10X

CaCl	1.0 g
H ₂ O destilada.....	1000.0 ml

Solución C 10X

MgCl 6H ₂ O.....	1.0 g
H ₂ O destilada.....	1000.0 ml

NOTA: Esterilizar por separado en autoclave y mezclar en frío las soluciones con la siguiente proporción.

80.0 ml de la solución A
100.0 ml de la solución B
100.0 ml de la solución C
720.0 ml de agua destilada estéril

Ajustar a pH 7

A.1.2 Solución madre de colorante de Giemsa (9)

Giemsa en polvo.....	0.5 g
Glicerol.....	27.0 ml
Metanol.....	41.0 ml

NOTA: Antes de usar se diluye 1:50 con PBS o Agua destilada.

A.1.3 Indicador de Andrade pH 5 + 8 (9)

Peptona.....	10.0 g
NaCl.....	5.0 g
H ₂ O destilada.....	1000.0 ml

A.1.4 Bicarbonato de sodio 4.4% con CO₂ (43)

Bicarbonato de sodio (NaHCO).....	4.4 g
Rojo de fenol 1%.....	2 gotas

A.1.5. Solución de Penicilina -Estreptomicina 100X (43)

Penicilina G sódica.....	1,000,000 UI
Estreptomicina.....	1.0 g
Agua bidestilada.....	10.0 ml

A.1.6. Solución de Lincomicina y Polimixina B (13, 35)

Las soluciones de antibióticos se prepararon de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Peso} = \frac{\text{Volúmen (ml)} \times (\text{ug / ml})}{\text{Potencia}}$$

	<u>Lincomicina</u>	<u>Sulfato de polimixina B</u>
Especificaciones		
Volúmen:	0.1 ml	0.1 ml
Concentración:	100 ug / ml	10,000 UI / ml
Potencia:	850	7613

A.1.7 Solución de pre-hibridación

SSC 5X

Bloqueador al 1 %

N-laurilsarcocina al 0.1%

SDS al 0.02%

Notas: * Almacenar a -20°C.

* El bloqueador no se disuelve rápidamente, por lo que se sugiere calentar la solución (50 -70°C) antes de congelar

A.1.8 Solución de lavado

SSC 1X

SDS al 0.1%

Notas: * La solución se precalentó en baño maría a 65°C antes de usar.

A.1.9. Buffer A, B y C

Buffer A

Tris 100mM, pH 7.5

NaCl 150 mM.

Buffer B

Buffer A

Leche descremada al 5%

Buffer C

Tris 100 mM pH 9.5

NaCl 100 mM

MgCl₂ 50 mM

A.2 Medios de Cultivo

A.2.1. Gelosa especial (24)

Base para gelosa sangre.....	20.0 g
Peptona.....	2.5 g
Agar.....	15.5 g
Extracto de carne.....	1.5 g
Agua destilada.....	1000.0 ml

Ajustar a pH 7.2

A.2.2 Medio de crecimiento (43)

Medio Mínimo Esencial 10X (MEM) Base Earle 10%
Bicarbonato de Sodio 4.4 con CO₂ 2.5%
Solución de Penicilina - Estreptomocina (100X) 1.0 %
Glutamina 100X 2%
Suero fetal bovino inactivado 10%
Agua bidestilada estéril

A.2.3 Medio de Mantenimiento (43)

Medio Mínimo Esencial 10X (MEM) Base Earle 10%
Bicarbonato de Sodio 4.4 con CO₂ 5.0%
Solución de Penicilina - Estreptomocina (100X) 1.0 %
Glutamina 100X 2%
Suero fetal bovino inactivado 2%

B. METODOS

B.1 Método de conservación

B.1.1 Resiembra seriada. (24)

Es un método de conservación a corto plazo, en donde las cepas se siembran por picadura y estria en tubos con medio de cultivo carente de inhibidores, sustancias bactericidas y bacteriosticas. Los tubos se sellan con papel parafilm o parafina y se conservan a temperatura ambiente o de refrigeración .

B.1.2. Liofilización. (24)

Es un método de conservación a largo plazo. Este proceso consiste en la deshidratación de suspensiones microbianas congeladas y sometidas a bajas presiones de tal forma que el agua pasa del estado sólido al gaseoso sin pasar por el estado líquido. Durante el proceso se pierde gran cantidad de material por la formación de cristales de hielo por lo que es necesario usar un medio de soporte.

Método:

- 1.- Verificar la pureza de las cepas.
- 2.- Elegir una colonia característica , sembrarla masivamente en BAB e incubar de 18 - 24 h a 37°C.
- 3.- Cosechar la biomasa con hisopo y hacer una suspensión en 6 ml de suero glucosado al 7.5%.
- 4.- Realizar una cuenta viable por el método de Miles y Misra o técnica de la gota.
- 5.- Ennvasar 0.5 ml de la suspensión en viales estériles
- 6.- Guardar los viales a temperatura de congelación durante una hora
- 7.- Los viales se colocan en la cámara liofilizadora y se ajusta la presión y temperatura para que se lleve a cabo el de proceso de liofilización.
- 8.- Terminado el proceso los viales se colocan en un desecador con pentóxido de fosforo (agente deshidratante), hasta sellarlos y etiquetarlos.

B.2. Técnica de Miles y Misra (Técnica de la gota)

- 1.- Tomar 180 ul de una suspensión bacteriana en suero glucosado al 7.5% y colocarlos en el primer pozo de una microplaca
- 2.- Realizar diluciones dobles del pozo 2 al 12 utilizando CST como diluyente
- 3.- De cada dilución colocar 10 ul en placas de BAB
- 4.- Incubar las placas a 37°C por 24 h
- 5.- Cuantificar la viabilidad utilizando la siguiente formula:

$$\frac{\text{Promedio del número de colonias}}{\text{Factor de dilución por volúmen}} = \text{UFC / ml}$$

B.3 Cuenta viable de las células y preparación de microplacas de 96 pozos con cultivo celular confluyente de células VERO.

B.3.1 Pase celular de botella a microplaca.

- 1.- Seleccionar botellas de 75 cm³ con una confluencia celular de 90 - 100%.
- 2.- Preparar medio de crecimiento (MEM) y tripsina-verseno al 0.025%.
- 3.- Descartar el medio de cultivo por el lado contrario a la monocapa y agregar 2 ml de tripsina-verseno .
- 4.- Dejar actuar la tripsina- verseno residual aproximadamente 2 minutos a 37°C.
- 5.- Revisar la botella hasta observar la disgregación de las células.
- 6.- Agregar 5 ml de medio de crecimiento complementado y homogenizar .
- 7.- Tomar 0.1ml de esta suspensión para hacer la cuenta celular.

de la suspensión celular.

- 1.- Preparar una dilución 1:10 de la suspensión celular, utilizando azul de tripano.
- 2.- Para la cuenta celular se utiliza una cámara de New-bauer y se coloca una gota de la suspensión 1:10 en cada extremo .
- 3.- Contar 8 cuadrantes y sacar el promedio.
- 4.- Ajustar la dilución de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Promedio del } \times \text{ factor de } \times 10,000}{\text{\# de células} \quad \text{dilución}} = 1 : X$$
$$\text{\# de células desecadas por / ml}$$

X: dilución.

- 4.- Ajustar la suspensión celular de acuerdo al número de requerido y colocar 180 ul de la suspensión por pozo. Agitar
- 5.- Etiquetar la microplaca con los siguientes datos:

Línea celular.

Número de pase.

Tipo de ensayo

Fecha.

B.4. Técnica para fijar preparaciones de células.

- 1.- Preparar una microplaca de 24 pozos con pequeños fragmentos de cubreobjetos, previamente desengrasados y esterilizados.
- 2.- Adicionar 180 ul de la suspensión celular e incubar a 37 °C hasta obtener una confluencia celular de 90-100%
- 3.- Adicionar 20 ul del sobrenadante que previamente haya dado efecto citotónico y citotóxico en CC.
- 3.- Incubar la microplaca a 37°C de 24 - 96 h
- 4.- Revisar diariamente y fijar las preparaciones según se presente el efecto.
- 5.- Eliminar el medio de cultivo, procurando no dañar la monocapa de células.
- 6.- Lavar las células con solución de PBS estéril
- 7.- Fijar las preparaciones con metanol absoluto
- 8.- Secar los fragmentos de cubreobjetos y teñir durante 30 minutos con colorante de Giemsa 1 : 50
- 9.- Lavar con PBS hasta quitar el exceso de colorante.
- 10.- Montar cada preparación en portaobjetos utilizando resina .

**B.5. Relación estadística del número más probable de microorganismos.
Tabla de Mac Cray**

Datos

Tubos inoculados:

3 con 1 ml dilución 1: 10 = 0.1g muestra
 3 con 1 ml dilución 1:100 = 0.01g muestra
 3 con 1 ml dilución 1:1000 = 0.001g muestra

<u>Tubos positivos</u>			NMP / g	<u>Tubos positivos</u>			NMP / g
3 (0.1)	3 (0.01)	3 (0.001)		3 (0.1)	3 (0.01)	3 (0.001)	
0	0	0	3.0	2	0	0	9.1
0	0	1	3.0	2	0	1	14.0
0	0	2	6.0	2	0	2	20.0
0	0	3	9.0	2	0	3	26.0
0	1	0	3.0	2	1	0	15.0
0	1	1	6.1	2	1	1	20.0
0	1	2	9.2	2	1	2	27.0
0	1	3	12.0	2	1	3	34.0
0	2	0	6.2	2	2	0	21.0
0	2	1	9.3	2	2	1	28.0
0	2	2	12.0	2	2	2	35.0
0	2	3	16.0	2	2	3	42.0
0	3	0	9.4	2	3	0	29.0
0	3	1	13.0	2	3	1	36.0
0	3	2	16.0	2	3	2	44.0
0	3	3	19.0	2	3	3	53.0
1	0	0	3.6	3	0	0	23.0
1	0	1	7.2	3	0	1	39.0
1	0	2	11.0	3	0	2	64.0
1	0	3	15.0	3	0	3	95.0
1	1	0	7.3	3	1	0	43.0
1	1	1	11.0	3	1	1	75.0
1	1	2	15.0	3	1	2	120.0
1	1	3	19.0	3	1	3	160.0
1	2	0	11.0	3	2	0	93.0
1	2	1	15.0	3	2	1	150.0
1	2	2	20.0	3	2	2	210.0
1	2	3	24.0	3	2	3	290.0
1	3	0	16.0	3	3	0	240.0
1	3	1	20.0	3	3	1	460.0
1	3	2	24.0	3	3	2	1,100.0
1	3	3	29.0	3	3	3	+1,100.0

XVI. REFERENCIAS

- 1.- Acheson D.W.K. 1992. Enterotoxins in the infection diarrhea . J. Infec . 24 : 225 - 245
- 2.- Arnold, E. 1991. Foodborne Illness. Lancet Review : 9-85.
- 3.- Belongia, E. A., Belongia, K. L. Mac Donald, G. L. Parham, K. E. White, J. A. Korlath, M. N. Lobato, S. M. Strand, K. A. Casale, and M. Osterholm. 1991. An Outbreak of *Escherichia coli* O:157H:7 Colitis Associated with Consumption of Precooked Meat Patties. J. Infect. Dis. 164:338 -343.
- 4.- Benítez, O., F. Uribe, A. Navarro, D. Hernández, J. Ruz, A. Cravioto. 1991. Etiología de diarrea con sangre en niños de una comunidad rural. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 48 (2) : 65 - 70.
- 5.- Brown, E., O. Sethabutr, M. P. Jackson, S. Lolekha, and P. Echeveria 1989. Hybridization of *Escherichia coli* Producing Shiga-like Toxin I, Shiga-like II, and variant of Shiga-like Toxin II with synthetic Oligonucleotide Probes. Infect. Immun. 57 (9) : 2811 -2814.
- 6.- Brown, J.E., P. Echeverria and A. Linberd. 1991. Digalactosyl - containing glycolipids as cell surfaces receptors for Shiga toxin of *Shigella dysenteriae* 1 and related cytotoxins of *Escherichia coli* . Rev. Infect Dis. 13 : S298 - 303.
- 7.- Carta a la Salud. La Diarrea del Turista y el Cólera. 1991. Fundación Mexicana para la Salud. 2 (3) : 1 - 4.
- 8.- Chart, H., S.M. Scotland, B. Rowe. 1987. Detection of very cytotoxin produced by strain of *Escherichia coli* grown in iron replece and iron restricted media. Abs. Int. Symp. Workshop Verotoxin-Producing *Escherichia coli*. Toronto. STF-8.
- 9.- Cowan , ST, Steel KJ. 1974. Manual for the identification of bacterial medical. Second Edition .Cambridge University Press. Cap. 7
- 10.- Cravioto, A., R.J. Gross, S.M. Scotland, and R.B. Rowe. 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. Curr. Microbiol. 3 : 95 -99.

- 11.- Cravioto, A., V. Vazquez, A. Soria, A. Navarro, M. Ortíz. 1988. Producción de citotoxina tipo shiga (SLT) I en cepas de *E. coli* aisladas de niños con diarrea en una comunidad rural. Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. 45 : 206 - 210.
- 12.- De S.N., Bhattacharga K, Sarkar J.K. 1957. A study of the pathogenicity of strains of bacterium coli from acute and chronic enteritis. J. Pathol. Bacteriol. 71: 201-209.
- 13.- Dohohue-Rolfe A., G. Keush. 1983. Shigella dysenteriae cytotoxin: periplasmic protein releaseable by polymixin B and osmotic shock. Infect. Immun 39 (1): 270-274.
- 14.- Donohue-Rolfe A., DWK. Acheson and J.T. Keuch. 1991. Shiga Toxin: Purification structure, and function. . Rev. Infect. Dis. 13: S293 -297.
- 15.- Dupont, H.L., S.B. Formal, R.B. Hornick, M. Snyder, J.P. Libonati. 1971. Pathogenesis of *E. coli* diarrhea. N. Engl. J. Med. 285: 1-9.
- 16.- Edelman, R., M. A. Karnali, and P. A. Fleming. 1988. Summary of International Symposium and Workshop on Infections Due to Verocytotoxin Shiga - Like toxins producing *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. 157 (5) : 1102 - 1104.
- 17.- Endo, Y., Tsurugi K, T. Yutsudo, Y.O. Takeda and K. Igarashi. 1988. Site of action of a Vero toxin (VT-2) from *Escherichia coli* O:157H:7 and of Shiga toxin on Eucariotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of toxins. Eur J. Biochem. 171: 45 - 50.
- 18.- Farmer, J.J., B.R. Davis, F.W. Hichman - Brenner, A. McWhorter, G.P. Huntley Carter, M.A. Asbury, C. Riddle, H.G. Athen - Grady, C. Elias, R. Fanning, A. G. Steigewalt, C. M. O' Hara, G. K. Morris, P.B. Smith, J. Brenner. 1985. Biochemical Identification of New species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. J. Clín. Microl. 21 : 46 - 76.
- 19.- Fletcher, J.N., J.R. Saunders, R.M. Batt, H. Embaye, B. Getty. 1990. Attaching effacement of the rabbit enterocyte brush border is encoded on a single 96.5-kilobase-pair plasmid in an enteropathogenic *E. coli* O:111 strain. Infect. Immun 58:1316-1322.

- 20.- Gangarosa, E.J. and M.H. Merson. 1977. Epidemiologic assessment of the relevance of the so-called enteropathogenic serogroups of *Escherichia coli* in diarrhea. *N. Engl. J. Med.* 296 (21):1210-1213.
- 21.- García- Elorriaga, G.. Determinación de factores de virulencia de *Escherichia coli* adherente causantes de diarrea en humanos. Tesis Doctoral ENCB-IPN.
- 22.- García-Mendoza E. 1985. Determinación de toxinas LT, VT y factores CFA / I, CFA / II en 365 cepas de *E. coli* aisladas de niños recién nacidos con y sin diarrea. Tesis profesional. ENCB-IPN .
- 23.- Gemmell, C. G. 1984. Comparative study of the nature and Biological activities of Bacterial Enterotoxins. *J. Med. Microbiol.* 17: 217 - 235.
- 24.- Giono S. 1979. Conservación y mantenimiento de microorganismos. *Bioquímica.* 2 (4): 379 - 382.
- 25.- Giono S., A. Escobar, J.L. Valdespino. 1993. Diagnostico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Secretaria de Salud. Subsecretaria de Coordinación y Desarrollo. INDRE. Unidad I-III
- 26.- Gorbach, S.L., B.H. Ken, D.G. Evans, D.J. Evans and D. Bessudo. 1975. Travelers Diarrhea and Toxigenic *Escherichia coli*. *N. Engl. J. Med.* 292 (18): 933-936.
- 27.- Grandsen WR., MAS. Damm, ID. Anderson, JE Carter , H. Lior. 1986. Further evidence associating hemolytic uremic syndrome with infection by Verotoxin-producing *Escherichia coli* O:157 H:7. *J. Infect. Dis.* 154 : 522 - 524.
- 28.- Guerrant. R.L., J.M. Hughes, B. Chang, D.C. Robertson and F. Murad. 1980. Activation of intestinal guanylate y clease by heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: studies of tissue specificity, potential receptors, and intermediates. *J. Infect. Dis.* 142 (2): 220-228.
- 29.- Haldane D.J.M., MAS Damm, J. Anderson. 1986. Improved biochemical screening procedure for small clinical laboratories for Vero (Shiga-like) toxin producing. *J. Clin. Microbiol.* 24: 652-653.

- 30.- Herrera, A. P. 1987. **Determinación de Enterotoxina termolábil (LT), citotoxinas VERO (VT) y semejante a Shiga (SLT) en cepas de *Escherichia coli* aisladas de niños con y sin diarrea.** Tesis profesional IPN: 1 - 74.
- 31.- Ish-Shalom, N., G.S. Arbus, MA Karmali, M. Petric. 1987. **Clinical and Prognostic Features of Verotoxin (VT)-producing *E. coli* (VTEC) Associated Hemolytic uremic syndrome (HUS).** Abstr. Int. Symp. Workshop Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli*. Toronto. HUS-II.
- 32.- Jhonson, W.M., H. Lior, GS. Bezonson. 1983. **Cytotoxin *Escherichia coli* O:157H:7 associated with haemorrhagic colitis in Canada.** Lancet; i: 76.
- 33.- Karch, H., T. Meyer. 1989. **Evaluation of oligonucleotide probes for identification of Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli*.** J. Clin. Microbiol. 27 (6): 1180-1186.
- 34.- Karmali, M. 1989. **Infection by Verotoxin - Producing *Escherichia coli*.** Clin. Microbiol. Rev. 2: 15-30.
- 35.- Karmali, M., MA. Petric, C. Lim, R. Cheung, GS Arbus. 1985. **Sensitive Method for detecting Low number of Verotoxin producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use of colony sweeps and polymixin extraction of verotoxin.** J. Clin. Microbiol. 122: 614 - 619.
- 36.- Kauffman, F., AE. Dupont. 1950 ***E. coli* from infantile gastroenteritis.** Acta Pathol Microbiol. Immunol Scand. 27: 552 -564.
- 37.- Keusch, G.T., Jacewicz, M., Mobassaleh, M., Donohue-Rolfe. 1991. **Shiga toxin: Intestinal cells receptors and pathophysiology of enterotoxic.** Rev. Infect. Dis. 13: S304-310.
- 38.- Konowalchuk, J., N. Dickie, S. Stavric and J.I. Speirs. 1977. **Properties of an *Escherichia coli* cytotoxin.** Infect. Immun. 20 (2): 575 -577.
- 39.- Lambden, A. 1973. **Applications and Evaluation Methods for Laboratory Immunological and Microbiological Reagents. Bacterial, Fungal and Parasitic Reagents.** 4ta. ed. E.U.; DHEW, PHS, HSMHA, CDC.

- 40.- Lennette E. 1985. **Manual of Clinical Microbiology**. AMS, Washington D.C. 213-218
- 41.- Levine MM. 1987. ***E. coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent**. *J. Infect. Dis.* **155**: 377 - 389.
- 42.- Levine MM and R. Edelman. 1984. **Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea** *Epidemiology. Microbiol. Rev.* **6**: 31- 50.
- 43.- **Manual de Virología**. Instituto Politécnico Nacional - Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Departamento de Microbiología. México, D.F. 1989. ISBN 968-29-2449
- 44.- March, S.B., S. Ratnam. 1986. **Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O:157H:7 associated with hemorrhagic colitis**. *J. Clin Microbiol* **23**: 869-872.
- 45.- Márques, L. R.M. , M. A. Moore, J. G. Wells, I. K. Wachsmuth, and A. D. O' Brien. 1986. **Production of Shiga - Like toxin by *Escherichia coli***. *J. Infect. Dis.* **15** (2)
- 46.- MMRWR.1993. **Preliminary Report Foodborne Outbreak of *Escherichia coli* O:157H:7 Infections from Hamburgers Western United States**. *CDC.* **42** (4) : 85 - 86.
- 47.- Neter, E., C.N. Shumway. 1950. ***E. coli* serotype D433: Occurrence in intestinal and respiratory tracts, cultural characteristics, pathogenicity, sensitivity to antibiotics**. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **75**:504-507.
- 48.- Newland, J.W., N. Strockbine and R. J. Neill. 1987. **Cloning of genes for Production of *Escherichia coli* shiga - like toxin type II**. *Infect. Immun.* **55** (11) : 2675 - 2680.
- 49.- Newland, J.W. and R. J. Neill. 1988. **DNA probes for Shiga - like toxins I and II and for toxin - converting bacteriophages**. *J. Clin. Microbiol.* **26** (7) : 1292 - 1297.
- 50.- O'Brien, A.D. and R. K. Holmes. 1981. **Shiga and Shiga - Like Toxins**. *Rev. Microbiol.* **51** (2) : 206 220.
- 51.- O' Brien, A.D., J.W. Newland, S.F. Miller , R.K. Holmes, H.W. Smith, S.B. Formal. 1984. **Shiga-like toxin converting phage from *Escherichia coli* strain than cause hemorrhagic colitis on infantiles diarrhea**. *Since* **226**: 694-696.

- 52.- Olarte, J. 1976. Nuevos conocimientos en relación con la etiopatogenia de las diarreas. Bol. Med. Hosp. Infant. 33 (3): 595 - 606.
- 53.- Orskov I. O. 1977. Serology; Chemistry and genetics of and K antigens of *E. coli* Bacteriol. Rev. 41 (3): 667 - 710.
- 54.- Padhyf, N. V. and M. P. Doyle. 1992. *Escherichia coli* O:157H:7. Epidemiology, Pathogenesis and Methods for Detection in Food. J. Food Protection. 55: 555-565.
- 55.- Pai, CH., R. Gordon , HVSims , LE Bryan. 1984. Sporadic cases of hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* O:157H:7. Clinical epidemiological and bacteriologic feactures. Ann. Intern. Med. 101:738 -742.
- 56.- Parra -Maldonado N.R.1990. Frecuencia y Caracterización de cepas de *E. coli* productoras de citotoxinas (VTEC) en casos de diarrea en poblaciones urbana y rural. Tesis UNAM
- 57.- Petric, M., M. A. Karmali, G. S. Arbus, M. Roscoe, S. Loui and R.Cheung.1987. Effects of Cycloeximide and Puromycin on Cytotoxic activity of *Escherichia coli* Verocytotoxin (Shiga - Like Toxin) J. Clin. Microbiol. Rev. 25 (7):1265 - 1268.
- 58.- Petric, M., MA Karmali , S. Richardson, R. Cheung. 1987 . Purification and biological properties of *Escherichia coli* Verocytotoxin. FEMS. Microbiol. 41: 63 - 68.
- 59 Polotsky, Y.E. 1977. Pathogenic effect of enterotoxigenic *E. coli* and *E. coli* causing infantile diarrhoea. Acta Microbiol. Acad Sci Hung. 24: 221-236.
- 60.- Pouch-Downes, F., J. H. Green, K. Greene, N. Strockbine, J. G. Wells, I. K.Wachsmuth. Development and Evaluation of Enzyme - linked Immunosorbent. Assays for Detection of Shiga -like toxin I and Shiga -like II. Division of Bacterial Diseases, Center for Infectious Diseases Centers for Disease Control, Atlanta : 1 - 23.
- 61.- Remis, R.S., K.L. MacDonald, L.W. Riley, N.D. Puhf. J.G. Wells, B.R. Davis, P.A. Blake and M.L. Cohen . 1984. Sporadic cases of hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* O:157H:7. Ann. Intern. Med. 101: 623 - 626.

- 62.- Riley, L.W., R.S. Reims, S.A. Hegerson, H. BN. McGee, J.G. Wells, B.R. Davis, R.J. Herbert, E.S. Olcott, L.M. Johnson, N.T. Hargrett, P.A. Blake, and M.L. Cohen .1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N. Engl. J. Med. 308: 681 -685.
- 63.- Ritchie, M., S. Partington, J. Jessop, and M. T. Kelly. 1992 . Comparison of a Direct Fecal Shiga- like Toxin Assay and sorbitol - Mac Conkey Agar Culture for Laboratory Diagnosis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infection. J. Clin. Microbiol. 30 (2) : 461 - 464.
- 64.- Robins-Brown., R.M. 1987. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. Rev. Infect. Dis. 9 (1): 28-53.
- 65.- Rufz A. D., A.Cortes- Gómez, Ma. G. Eusebio - Hernandez, M. Flores -Valadez., G. Lugo L. Mota, J. Ma. Mora -Fuentes., M. Padiema; Olivos., P. Rodríguez- Montañó. 1983. Manual de Laboratorio de Microbiología Sanitaria. IPN.
- 66.- Scotland, S.M.1983 ." Toxins " J. of Applied Bacteriology Symposium Supplement.
- 67.- Scotland, S.M. , H.R. Smith and B. Rowe. 1985. Two distinct toxins active Vero Cells from *Escherichia coli* O:157H:7 . Lancet: 885 -886.
- 68.- Scaletsky, I.C., L.M. Silva, and L.R. Trabulsi. 1984. Distintive patterns of adherence of enteropatogenic *Escherichi a coli* to HeLa cells. Infect. Immun. 45 (2) : 534 - 536.
- 69.- Smith, H. 1984. The biochemical challenge of microbial pathogenicity. J. Applied Bacteriol. 7 : 395 - 404.
- 70.- Smith,H.R., S.M. Scotland, H. Chart and B. Rowe. 1987. Vero cytotoxin production and presence of VT genes in strains of *Escherichia coli* and *Shigella*. FEMS Microbiol. Letters. 42 : 173 -177.
- 71.- Smith, HR., JR Gross, B. Rowe, NK Fry. 1987 . Haemorrhagic colitis and Vero cytotoxin - producing *Escherichia coli* in England and Wales. Lancet. May. 1062 - 1063.

- 72.- Sussman, M. 1985. **Theodor Escherich (1857 - 1891). A biographical note In: The Virulence of *E. coli* . Reviews and Methods.** Special publications of Society for General Microbiology by Academic Press.
- 73.- Taylor, DN. P.Echeverria , P. Pai, J. Seriwatana, A. Chatkacomorakot , V. Khungua lertn , T. Sakaldaipera, R. Smit. 1986. **A comparative study of enterotoxin gene probes and test for toxin production to detect enterotoxigenic *Escherichia coli*.** J. Infect. Dis. 153 (2): 255-259.
- 74.- Tison, D.L. 1990. **Culture Confirmation of *Escherichia coli* Serotype O:157H:7 by Direct Immunofluorescence.** J. Clin. Microbiol. 28 (3) : 612 -613.
- 75.- Tohn., I., T. J. Barrett, M. L. Cohen, H.S. Rumschlag, J. H. Green, and I. K. Wachsmuth. 1991. **Enzyme - Liked Immunosorbent Assay for Products of the 60 Megadalton Plasmid of *Escherichia coli* serotype O:157H:7.** J. Clin. Microbiol. 1991. 29 (5): 1016 - 1019.
- 76.- Toledo, MRF., MCB Alvariza , J. Murahouschi, SRTS Ramos , L.R. Trabulsi. 1983. **Enteropathogenic *E. coli* serotypes and endemic diarrhea in infants.** Infect. Immun. 39 :586 -589.
- 77.- Tzipori S., H. Karch, I.K. Wachsmuth. **Role of a 60 megadalton plasmid and Shiga-like toxins in the pathogenesis of infection caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O:157H:7 in gnotobiotic pigles .** Infect. Immun. 55: 3117-3125.
- 78.- Vazquez, V., M. Arredondo, F. Trujillo y A. Cravioto. **Relación entre aislamiento de cepas *E. coli* O157H:7 y presencia de colitis hemorrágica en niños.** Bol. Medico Hosp. Inf. México. 44: 442 - 447.
- 79.- Wells, J.R. , L.D. Shipman , K.D. Greene, E.G. Sowers, J.H. Green, D.N. Cameron, F.P. Downes, M.L. Martín, P.M. Griffin. 1991. **Isolation of *Escherichia coli* serotype O:157H:7 and other Shiga like- toxin-Producing *E. coli* from dairy cattle.** J. Clin. Microbiol. 29 (5):985-989.
- 80.- Whittam, T. S. , I. K. Wachsmuth, and R. A. Wilson. 1988. **Genetic Evidence of Clonal Descent of *Escherichia coli* O:157H:7 Associated with Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome.** J. Infect. Dis. 157 (6) : 1124 - 1133.

- 81.- Willshaw, G.A., S. M. Scotland, H. R. Smith and B. Rowe. 1992. Properties of Vero Cytotoxin - producing *Escherichia coli* of human origin of serogroups other than O:157. *J. Infect. Dis.* 166 : 797 -802.
- 82.- Willshaw,G.A., H.R. Smith, S.R. Scotland, A.M. Field and B. Rowe. 1987. Heterogeneity of *Escherichia coli* Phages Encoding Vero Cytotoxins: Comparison of Cloned Sequences : Determining VT-1 and V2 and Development of specific Gene Probes. *J. of General Microbiol.* 133: 1309 -1317.
- 83.- Willshaw,G.A., H.R. Smith, S.M. Scotland and B. Rowe. 1985 .Clonig of Genes Determining the production of Vero cytotoxin by *Escherichia coli*.. *J. of General Microbiol.* 131 : 3047 - 3053.
- 84.- Zepeda-López , H.M. J. Torres, S. Giono. 1985. Posible producción de 2 citotoxinas por una cepa de *E. coli*.. *Bol. Med Hosp Infant.* 42 (5):310-312.
-